



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

TESIS DOCTORAL

Desinfección con ozono de los conductos radiculares tratados endodóncicamente

Viviana Clelia Lüdi Etchevarren

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOXÍA.

AVANCES CIENTÍFICOS E INICIACIÓN Á
INVESTIGACIÓN EN ODONTOESTOMATOLOXÍA

FACULTAD DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA.

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015

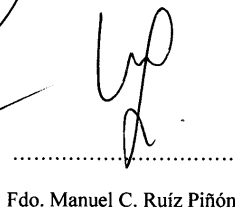
AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. José González Bahillo y D. Manuel Carlos Ruíz Piñón, profesores del Departamento de Estomatología y D. Rafael Seoane Prado, Profesor del Departamento de Microbiología e Parasitología, como Directores de la Tesis de Doctorado titulada “Desinfección con ozono de los conductos radiculares tratados endodóncicamente” presentada por Dña. Viviana Clelia Lüdi Etchevarren, alumna del Programa de Doutoramento titulado: “Avances científicos e iniciación á investigación en Odontoestomatología”.

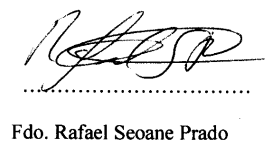
Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, y que como directores de la misma no incurren en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.



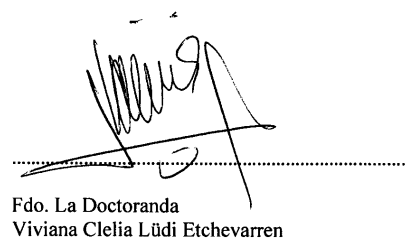
Fdo. José González Bahillo



Fdo. Manuel C. Ruíz Piñón



Fdo. Rafael Seoane Prado



Fdo. La Doctoranda
Viviana Clelia Lüdi Etchevarren

A LA MEMORIA DE MIS PADRES:

ONDINA Y FREIN

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quiero agradecer a los directores de este trabajo, los profesores: Rafael Seoane Prado, José González Bahillo y Manuel Ruíz Piñón, por confiar en mí, sobre todo por tratarse de un tema tan controvertido como el ozono.

A mi compañero del Departamento de Microbiología, Antonio Javier Pérez Estévez, que con su profesionalidad siempre estuvo presente incondicionalmente.

A mi familia, porque a pesar del tiempo que llevo en la ardua tarea de realizar mi tesis doctoral nunca dejaron de creer en mí y alentarme.

Al Dr. Juan Carlos Pérez Olmedo, por introducirme en el mundo de la ozonoterapia y colaborar en la investigación sobre el tema.

Al Sr. D. Martín Benítez Najarro, Director general de GMB Ozone, quien colaboró con el equipamiento en pro de la ciencia, y en más de una oportunidad me socorrió para dilucidar alguna duda.

A los profesores y compañeros de la Unidad de Patología y Terapéutica Dental II, de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela.

A todos, mi más sincera gratitud, porque sin ellos esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

RESUMEN

Este trabajo valora el efecto del ozono gas sobre células planctónicas y biopelículas maduras de *E. faecalis*, principal responsable de la persistencia de la infección periapical y el fracaso endodónico. Se utilizaron dos equipos: uno de uso odontológico que proporciona una concentración máxima de ozono gas de 4 µg/mL, y otro de uso médico que consigue una concentración máxima de 80 µg/mL. Se utilizaron dos modelos experimentales.

1) Biopelículas de *E. faecalis* generadas experimentalmente en dientes extraídos. Se comparó la eficacia bactericida de ambos sistemas de generación, resultando el equipo médico más eficaz en la reducción de células viables tanto a 1, 7 y 14 días tras la aplicación del ozono.

2) Cultivos y biopelículas de *E. faecalis* generadas en microtubos de polipropileno. Nuestro novedoso modelo experimental simula las condiciones del tercio apical y elimina las variables concomitantes al uso de dientes (extensión de la infección y diferente acceso del ozono gas dependiente de la variabilidad anatómica de los conductos).

El ozono gas se aplicó: I) sobre células planctónicas en medio de cultivo líquido, II) directamente sobre las biopelícula. El ozono (20mL) se aplicó mediante una aguja patentada diseñada para este uso durante 60 segundos y a una concentración 20 µg/mL.

No hubo diferencias significativas entre la aplicación del ozono sobre células planctónicas con respecto al control. Por el contrario, sí hubo diferencias significativas entre las células recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente y las recuperadas de biopelículas control (reducción del 99,9%), así como, con las recuperadas de las biopelículas donde se ozonizó el medio de cultivo. Como control negativo de crecimiento se utilizó NaOCl (5,25% y 2,61%).

La eficacia bactericida mostrada por el ozono gas, unido a sus efectos beneficiosos (antiinflamatorio, angiogénico) y a la ausencia de efectos adversos apoyan su uso como terapia complementaria en la desinfección de los conductos radiculares.

PALABRAS CLAVE: Ozono, Endodoncia, Biopelícula, *Enterococcus faecalis*, Microtubos.

RESUMO

Este traballo valora o efecto do ozono gas sobre células planctónicas e biopelículas maduras de *E. faecalis*, principal responsable da persistencia da infección periapical e o fracaso endodónico.

Utilizáronse dous equipos: un de uso odontolóxico que proporciona unha concentración máxima de ozono gas de 4 µg/mL, e outro de uso médico que consegue unha concentración máxima de 80 µg/mL. Utilizaronse dous modelos experimentais.

1) Biopelículas de *E. faecalis* xeradas experimentalmente en dentes extraídos. Comparouse a eficacia bactericida de ambos os dous sistemas de xeración, resultando o equipo médico máis efectivo cunha maior redución de células viables tanto a 1, 7 e 14 días logo da aplicación do ozono gas.

2) Cultivos e biopelículas de *E. faecalis* xeradas en microtubos de polipropileno. O noso novo modelo experimental simula as condicións do terzo apical e elimina as variables concomitantes ao uso de dentes (extensión da infección e diferente acceso do ozono gas debido á variabilidade anatómica dos condutos radiculares).

O ozono gas aplicouse: I) sobre células planctónicas no medio de cultivo líquido, II) directamente sobre as biopelícula. O ozono (20mL) aplicouse mediante unha agulla patentada e deseñada para este uso durante 60 segundos e a unha concentración 20 µg/mL.

Non houbo diferenzas significativas entre a aplicación do ozono sobre células planctónicas con respecto ao control. Pola contra, si houbo diferenzas significativas entre as células recuperadas das biopelículas ozonizadas directamente e as recuperadas de biopelículas control (redución do 99,9%), así como, coas recuperadas das biopelículas onde se ozonizou o medio de cultivo. Como control negativo de crecemento utilizouse NaOCl (5,25% e 2,61%).

A eficacia bactericida mostrada polo ozono gas, unido aos seus efectos beneficiosos (antiinflamatorio, anxioxénico) e á ausencia de efectos adversos apoian o seu uso como terapia complementaria na desinfección dos condutos radiculares.

PALABRAS CHAVE: Ozono, Endodoncia, Biopelícula, *Enterococcus faecalis*, Microtubos.

ABSTRACT

This work assesses the effect of ozone gas on planktonic cells and mature biofilms of *E. faecalis*, major responsible for the persistence of the periapical infection and endodontic failure. Two appliances were used: one for dental use that provides a maximum concentration of ozone gas of 4 µg/mL, and other for medical use getting a maximum concentration of 80 µg/mL. Two experimental models were used:

1) *E. faecalis* biofilms experimentally generated in extracted teeth. We compare the bactericide effectiveness of both generation systems, resulting the medical equipment more efficient in reducing viable cells both to 1, 7 and 14 days after the application of the ozone

2) Cultures and *E. faecalis* biofilms generated in microtubes of polypropylene. Our new experimental model simulates the conditions of the apical and eliminates variables associated to the use of teeth (extension of the infection and anatomical variability of the duct).

Ozone gas was applied: I) on planktonic cells in liquid culture, II) directly on the biofilm. Ozone (20mL) was applied using a patented needle designed for this use for 60 seconds and a concentration 20 µg /mL. There were no significant differences between the application of ozone on planktonic cells relative to the control. On the contrary, there were significant differences between the cells recovered from control biofilms and those recovered from directly ozonized biofilms (reduction of 99.9%), as well as, with the recovered from the biofilm ozonated through the culture medium. NaOCl (5.25% and 2.61%) was used as negative control of growth.

The bactericidal efficacy of ozone gas, together with its beneficial effects (anti-inflammatory, antiangiogenic) and the absence of adverse effects support its use as a complementary therapy in disinfection of root canals.

KEY WORDS: Ozone, Endodontics, Biofilms, *Enterococcus faecalis*, Microtubes.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	15
1. Biopelículas	15
1.1. Concepto y relevancia clínica	15
1.2. Formación de las biopelículas	16
1.2.1. Adherencia al sustrato y formación de microcolonias	16
1.2.2. Maduración de la biopelícula	16
1.2.3. Liberación de las bacterias desde la biopelícula	17
1.3. Mecanismo de protección de las bacterias en la biopelícula	17
1.3.1. Interferencia en la penetración de los antimicrobianos	17
1.3.2. Modificaciones físico-químicas dentro de la biopelícula	18
1.3.3. Variabilidad fenotípica. Existencia de una fracción de bacterias dentro de la biopelícula que presenten un fenotipo resistente a los antibióticos	18
2. Microorganismos implicados en el fracaso endodóncico	19
3. Tratamiento endodóncico	19
3.1. Antibióticos	20
3.2. Hidróxido de Calcio	21
3.3. Hipoclorito de sodio (NaOCl)	21
3.4. Clorhexidina	22
3.5. EDTA	23
3.6. Soluciones irrigantes mixtas y/o modificadas	24
3.7. Otros métodos de desinfección	25
3.7.1. Sistema Endo Vac	25
3.7.2. RinsEndo	25
3.7.3. Sistema Endox	26
3.7.4. Sistemas sónicos y ultrasónicos	26
3.7.5. Tecnología láser y fotodinámica	27
3.8. Ozono	29
3.8.1. Formas de aplicación de la ozonoterapia	30
3.8.1.1. Ozono gas	30
3.8.1.2. Agua ozonizada	30
3.8.1.3. Disuelto en sangre, Autohemoterapia	31
3.8.2. Efecto Germicida del Ozono	32
3.8.2.1. Mecanismo de acción antimicrobiano del ozono	33
3.8.2.2. Dosis Terapéutica	34
3.8.2.3. Toxicidad	35
3.8.3. Breve revisión del uso del ozono en odontología	35
II. OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Aplicación de ozono gas sobre conductos radiculares previamente infectados con <i>Enterococcus faecalis</i>	45
1.1. Obtención de los dientes humanos	45
1.2. Preparación de los dientes	45
1.3. Limpieza de los conductos y conformación	45
1.3.1. Preflaring	45
1.3.2. Remoción de las interferencias y conformación del conducto	46
1.3.3. Gauging apical	46
1.3.4. Conformación final del conducto	46

1.3.5. Irrigación final	47
1.4. Preparación de los dientes para la experimentación	47
1.4.1. Montaje y enumeración	47
1.4.2. Inoculación de los conductos radiculares con <i>E. faecalis</i>	48
1.5. Procesamiento de los dientes inoculados	49
1.6. Análisis de infección previa de los dientes	49
1.6.1. Infección experimental	49
1.6.2. Aplicación del ozono gas a los conductos radiculares	51
1.6.3. Procesamiento de los dientes después de aplicar el ozono	53
2. Aplicación de ozono gas sobre E. Faecalis tanto en forma planctónica como biopelículas crecidos en microtubos de polipropileno.	54
2.1. Obtención de las biopelículas.....	54
2.2. Grupos experimentales	55
2.3. Contaje de colonias	56
2.4. Aparatología	57
2.5. Análisis Estadístico	58
IV. RESULTADOS.....	61
1. Efecto del ozono gas en dientes infectados con <i>E.faecalis</i> . Comparativa de la eficacia de dos equipos distintos generadores del ozono gas: GMB vs Prozone®.	61
2. Ensayo de actividad bactericida del ozono gas frente a <i>E.faecalis</i> cultivado en microtubos de polipropileno.	63
2.1. Efecto del ozono sobre células planctónicas de <i>E. faecalis</i>	64
2.2. Efecto del ozono gas sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i>	65
V. DISCUSIÓN.....	71
1. Desinfección con ozono de dientes infectados <i>In Vitro</i> con <i>E. faecalis</i>	71
2. Evaluación de la capacidad bactericida del ozono sobre <i>E. faecalis</i> crecido en microtubos.....	73
VI. CONCLUSIONES	83



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica se ha observado que en un porcentaje de casos en los que se realiza una endodoncia siguiendo los procedimientos y tratamientos habituales se presentan fracasos debido a la aparición de crecimiento microbiano tras el tratamiento.

Existen dos causas fundamentalmente que expliquen la persistencia de la infección bacteriana en el sistema de los conductos radiculares:

- Que estos microorganismos pudiesen invadir los conductos como consecuencia de las filtraciones desde la corona de los dientes con tratamientos de conducto obturados, aunque un buen sellado hace esta posibilidad muy poco probable.

- Que el tratamiento con instrumentación mecánica e irrigantes haya sido incapaz de eliminar por completo la microbiota existente previa al tratamiento, de modo que pueda derivar en un crecimiento microbiano posterior. Esta capacidad de supervivencia bacteriana es la causa más común en el fracaso endodóncico.

Diversos factores podrían explicar la capacidad de supervivencia bacteriana al tratamiento. Por un lado, las irregularidades anatómicas propias de la estructura de los conductos dificultan una efectiva eliminación mecánica del sitio de la infección y, asimismo, limitan considerablemente el acceso de agentes antimicrobianos al mismo, por otro lado, la capacidad de las bacterias de formar biopelículas les confiere una elevada resistencia frente a la mayoría de los antimicrobianos, dificultando de este modo su total erradicación (1-4), Probablemente ambos factores unidos sean la causa de la supervivencia bacteriana y el posterior fracaso endodóncico.

1. BIOPELÍCULAS

1.1. Concepto y relevancia clínica.

Las biopelículas pueden definirse como una comunidad bacteriana altamente organizada adherida a una superficie y recubierta por una matriz extracelular de exopolisacáridos

secretada por ellas mismas, que las protege tanto de la acción inmunológica del individuo como de los agentes antimicrobianos (5), (Fig. 1).

Los avances de la microscopía electrónica permitieron que en la década de los 90 del siglo pasado se comenzara a entender realmente el modo en que las bacterias se organizaban en este tipo de comunidades. La importancia de estas estructuras reside en que no sólo protege a los microorganismos de la respuesta del huésped y de antibióterapias convencionales, sino que actúan como una especie de “superorganismo” con diferentes patrones de expresión genética y de actividad metabólica en diferentes regiones de la biopelícula así como una elevada frecuencia de intercambio de información genética. Además, la estructura de la matriz extracelular presenta canales para la circulación de nutrientes que permiten la existencia de microambientes muy variables (6). Por otra parte, estas bacterias en forma sésil parecen estar en una especie de estado latente y en un momento dado pueden desprenderse de la biopelícula como bacterias planctónicas, multiplicándose y dispersándose pudiendo provocar una nueva infección. Las biopelículas funcionarían entonces como un reservorio de bacterias “durmientes” protegidas que, tal vez por simple desprendimiento o como respuesta a algún estímulo del huésped, podrían reactivarse pasando a estado infeccioso.

1.2. Formación de las biopelículas.

1.2.1. Adherencia al sustrato y formación de microcolonias.

Las bacterias se adhieren a la superficie en un proceso que engloba la expresión específica de determinados genes y, probablemente, la supresión de otros. Una vez adheridas empiezan a crecer formando pequeñas microcolonias que poco a poco se van uniendo de un modo no homogéneo favoreciendo así la aparición de huecos que serán los futuros canales internos de la biopelícula, este proceso se denomina coalescencia. Es en esta fase cuando parece iniciarse la transcripción de algunos genes implicados en la síntesis de la matriz externa.

1.2.2. Maduración de la biopelícula.

Cuando se alcanza una densidad crítica de bacterias una señal química dispara la expresión de todos los genes implicados en la producción de la matriz de exopolisacáridos en

la cual quedarán integradas las bacterias, a través del fenómeno conocido como *quorum sensing*.

1.2.3. Liberación de las bacterias desde la biopelícula.

La simple acción de fenómenos físicos o químicos en la superficie de la biopelícula puede permitir que algunos fragmentos de la misma se desprendan y puedan adherirse a otras zonas iniciando así la formación de una nueva biopelícula. Por otra parte, de la misma forma que en el proceso de maduración, algunas señales químicas podrían iniciar una cascada metabólica que finalice en la liberación de células planctónicas desde la biopelícula al exterior y, de este modo, multiplicarse y colonizar nuevas zonas.

1.3. Mecanismo de protección de las bacterias en la biopelícula.

Como hemos mencionado anteriormente, los microorganismos que crecen formando biopelículas presentan una mayor resistencia que las células planctónicas a los diferentes agentes de control. De hecho, la CMI (concentración mínima inhibitoria) de un antibiótico frente a una bacteria en una biopelícula es unas 1000-1500 veces mayor que cuando la bacteria se encuentra en forma planctónica (6). Este fuerte aumento en la resistencia a antibióticos no puede ser explicado por los mecanismos de adquisición de resistencias convencionales. Así, cuando las bacterias se liberan de una biopelícula rápidamente se convierten en susceptibles a los antibióticos, lo que sugiere que la resistencia exhibida en las biopelículas no fue adquirida a través de mutaciones o transferencia genética. Existen tres teorías que explican este aumento de la resistencia:

1.3.1. Interferencia en la penetración de los antimicrobianos

La presencia de una matriz extracelular, generalmente de naturaleza polisacáridica limita el acceso de los agentes de control a las bacterias que crecen en la parte interna de las biopelículas. Así, los anticuerpos sólo pueden bloquear a las bacterias planctónicas pero no a las que se encuentran en el interior de la biopelícula, del mismo modo, los fagocitos tampoco pueden acceder, de modo que su acción se ve limitada al exterior de la matriz, es más, en este caso, la liberación de enzimas fagocíticas puede resultar en un daño de los tejidos circundantes. Por otro lado, los agentes antimicrobianos pueden ser desactivados en la parte externa de la matriz o sufrir un retardo en la penetración, así, antibióticos con cargas positivas

podrían unirse a las moléculas cargadas negativamente existentes en la matriz (aminoglicósidos).

1.3.2. Modificaciones físico-químicas dentro de la biopelícula.

La dificultad de difusión de las moléculas dentro de la biopelícula genera diferentes gradientes de concentración en la misma, así, acumulaciones de productos ácidos pueden llevar a diferencias de pH mayores de una unidad que podría resultar en la inactivación de determinados antibióticos. Por otro lado, la existencia de un microambiente alterado dentro de la biopelícula puede inducir un estrés osmótico en las bacterias, como consecuencia del cual la proporción de porinas se vería alterada con la consecuente reducción de la permeabilidad a antibióticos. Además, la acumulación o ausencia de algunos sustratos en el interior de la biopelícula hace que las bacterias entren en una fase de estasis o de latencia, no proliferativa, que las protege de la acción de muchos antibióticos que requieren que las bacterias se encuentren en estado proliferativo para ser efectivos (penicilinas).

1.3.3. Variabilidad fenotípica. Existencia de una fracción de bacterias dentro de la biopelícula que presenten un fenotipo resistente a los antibióticos.

Como ya hemos mencionado el crecimiento en biopelículas permite la aparición de variaciones fenotípicas originadas por las diferencias microambientales y el *quorum-sensing* que pueden permitir la aparición de bacterias fenotípicamente resistentes, así, la adquisición de un fenotipo resistente en una pequeña población de bacterias dentro de una biopelícula no sería debida a la falta de nutrientes, sino más bien como una respuesta biológica al crecimiento sobre una superficie. Esto podría explicar que aunque la mayoría de las bacterias liberadas de una biopelícula son susceptibles a los antibióticos, en algunos casos, pequeñas poblaciones (< 1%) presentan resistencia a los mismos.

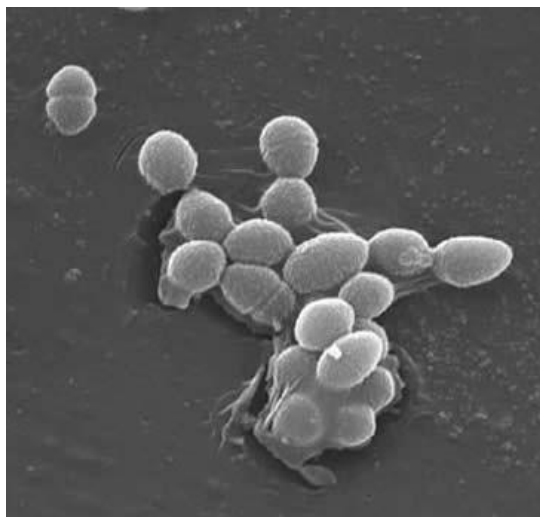


Fig. 1: Biopelículas de *E. faecalis*

2. MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN EL FRACASO ENDODÓNCICO.

En las infecciones endodóncicas primarias o en dientes no tratados por endodoncia con necrosis pulpar que presenten infección existe una microbiota mixta, compuesta principalmente por microorganismos anaerobios estrictos tanto Gram negativos como Gram positivos. Sin embargo, en los dientes con fracaso en el tratamiento endodóncico la microbiota encontrada es por el contrario mayoritariamente Gram positiva y facultativa, siendo *E. faecalis* la especie aislada con mayor frecuencia, llegando a alcanzar una prevalencia de alrededor del 70%. (2,7-10).

Varias características de *E. faecalis* pueden estar relacionadas con su elevada prevalencia en el fracaso endodóncico. Su característica fundamental es que posee una elevada capacidad de supervivencia en condiciones de escasez de nutrientes como la presente en los conductos radiculares de dientes sometidos a tratamiento endodóncico. Otra característica relevante es su capacidad para sobrevivir en medios alcalinos (11-13), lo que le hace bastante resistente a uno de los agentes antimicrobianos más utilizados como medicamento intrarradicular, el Ca(OH)_2 (14). De este modo, *E. faecalis* puede sobrevivir a los tratamientos a corto plazo como los irrigantes o soluciones de tratamiento y, cuando la acción de éstos finaliza, proliferar e infectar el conducto radicular (15). Finalmente, es capaz de formar biopelículas bajo condiciones de difícil crecimiento, lo que les confiere una elevada resistencia a la medicación intraconducto (17-22).

3. TRATAMIENTO ENDODÓNCICO

El objetivo de cualquier tratamiento de endodoncia es la erradicación completa de la infección así como garantizar la estructura del diente tratado. La acción mecánica de desbridamiento sólo elimina aproximadamente el 50% de las bacterias, ya que éstas pueden encontrarse en el entramado de conductos que conforman la compleja estructura interna del diente. Debido a ello se han propuesto una serie de aproximaciones y técnicas coadyuvantes con el fin último de eliminar la infección completamente antes de sellar el conducto. Entre ellas destacan:

3.1. Antibióticos

En infecciones odontogénicas crónicas el uso de antibióticos sistémicos no es efectivo ya que estos dientes están asociados a pulpa sin vitalidad, con escaso o ningún aporte sanguíneo, por lo cual el antibiótico tomado oralmente no llega a alcanzar dentro del conducto radicular la concentración mínima inhibitoria para inhibir el crecimiento bacteriano (8).

Como se comentó anteriormente, la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos frente a las biopelículas es unas 1000-1500 veces mayor que la encontrada para las bacterias en forma planctónica, de este modo la terapia antibiótica simplemente invierte la gran variedad de síntomas causados por las células planctónicas liberadas de las biopelículas pero no es capaz de eliminar a éstas. Para alcanzar una concentración inhibitoria del antibiótico sobre las mismas habría que dar al paciente una dosis tan alta que no sería terapéutica (5).

Una alternativa a la terapia sistémica con antibióticos es el uso de medicación antibiótica intraconducto, ya sea como suplemento o a través de la liberación desde vehículos impregnados de los mismos. La gran ventaja de este procedimiento es que no requiere absorción gástrica ni paso por el torrente sanguíneo para llegar al punto de infección, lo que minimiza los efectos secundarios de los antibióticos y concentra su actividad en la zona deseada.

Un ejemplo de la adición de antibióticos a soluciones irrigantes es el MTAD, un irrigante que contiene ácido cítrico, tetraciclina y un agente surfactante como Tween-80 y que ha mostrado ser bastante efectivo frente a *E. faecalis* (23). En cuanto a la liberación de antimicrobianos desde vehículos impregnados con los mismos, es muy importante que la liberación de las sustancias activas sea lo suficientemente lenta para conseguir una concentración inhibitoria dentro del conducto continuada en el tiempo, así como que el

vehículo sea fácilmente eliminable y biodegradable. Lima *et al* (24) estudiaron la eficacia frente a *E. faecalis* de geles que combinaban antibióticos con clorhexidina y agentes surfactantes. En su estudio, la acción de la clorhexidina era fundamental, ya que sólo las formulaciones que la contenían eran capaces de eliminar las biopelículas de *E. faecalis*. En un reciente estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio se utilizaron esponjas biodegradables con una combinación de amoxicilina y clorhexidina, comprobando que la liberación de ambas sustancias alcanzaba una semana, más en el caso de la clorhexidina, y que era altamente eficaz en la eliminación de biopelículas de *E. faecalis* en dientes previamente infectados.

3.2. Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio es un polvo blanco que se obtiene por la calcinación del carbonato cálcico,



Posee un pH alcalino, aproximadamente de 11- 12, lo que lo convierte en un buen bactericida (14,25). Es el medicamento intraconducto más utilizado en los tratamientos endodóncicos por su eficacia contra la mayoría de los patógenos encontrados en las infecciones endodóncicas y por su biocompatibilidad (8). Habitualmente se utiliza como pasta mezclando el polvo con suero fisiológico o agua tratada, aunque también se utiliza en otros tipos de presentaciones.

Por el contrario, tiene como inconveniente que es difícil retirarlo de las paredes de los conductos radiculares tratados por endodoncia, condición indispensable para una buena obturación y sellado (25) y, así, evitar el fracaso del tratamiento.

3.3. Hipoclorito de sodio (NaOCl)

Es el irrigante más utilizado para la preparación químico-mecánica de los conductos radiculares. Normalmente las concentraciones utilizadas para el control bacteriano y la disolución tisular van del 2,5% al 6%, aunque existen estudios que muestran que una concentración del 3% ya resulta eficaz (24). De la misma manera, también se ha observado que existen poblaciones bacterianas que son sensibles a concentraciones del 0,5% (26). Como es bien conocido, el hipoclorito de sodio es un potente agente antibacteriano, probablemente el más eficaz hasta la fecha. Además posee la capacidad de producir la disolución tisular, de

eliminar el detrito creado y de lubricar los instrumentos durante la instrumentación mecánica del conducto (27). Es también desmineralizante, blanqueante y desodorante. Sin embargo, presenta diversos inconvenientes que aconsejan tener mucha precaución en su utilización ya que es tóxico a altas concentraciones, debilita la dentina causando la reducción de su resistencia a la flexión haciendo que el diente sea más susceptible a la deformación y fractura (28-29). De hecho, si llega a rebasar el periápice puede causar serios inconvenientes, accidentes tales como inflamación, dolor, edema, hemorragias, necrosis de los tejidos circundantes y descamaciones en las células orales (28, 29). Así, diferentes trabajos han observado la citotoxicidad de NaOCl al 5,25% sobre el tejido periapical, autores como Nagayoshi *et al* (30) han demostrado que incluso las concentraciones más bajas utilizadas en endodoncia producen fuertes daños celulares en líneas de fibroblastos de ratón L-929.

Además, puede causar corrosión y deterioro del instrumental, incrementando el riesgo de fractura del mismo con el riesgo de que algunos pequeños fragmentos permanezcan en la cavidad, afectando a la conformación del sistema de conductos radiculares y dificultando la limpieza de los mismos (31-32).

Finalmente los residuos sobrantes de la irrigación de los conductos radiculares durante el tratamiento que son aspirados por el equipo dental también producen corrosión en dicho equipo, y, en última instancia, estos residuos terminan contaminando las aguas residuales urbanas.

3.4. Clorhexidina

Es una bisguanida catiónica con óptima actividad antimicrobiana en un rango de pH 5,5-7,0. Su acción es de amplio espectro (bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras) siendo bacteriostática a bajas concentraciones y bactericida a altas (Fig. 2).

La acción antibacteriana se debe a la capacidad de la clorhexidina de romper las membranas citoplasmáticas de las bacterias.

Posee ventajas clínicas que justifican su utilización en diferentes presentaciones: colutorio, gel, pasta de dientes etc. Las principales ventajas son: actividad antimicrobiana de amplio espectro, sustantividad y baja toxicidad. La sustantividad es la capacidad de un agente para unirse a diferentes localizaciones (la clorhexidina en los dientes se une a la

hidroxiapatita) y liberarse lentamente en forma activa manteniendo los niveles eficaces durante más tiempo.

La concentración más utilizada en soluciones irrigantes es del 2%. Aunque a concentraciones inferiores tiene un efecto *in vitro* similar al del NaOCl, los estudios *in vivo* demostraron una menor eficacia que el NaOCl. Esto podría explicarse por la capacidad de este último compuesto de disolver el material orgánico y así permitir un flujo más efectivo del irrigante.

En estudios de actividad *in vitro* de diferentes combinaciones de antimicrobianos en forma de gel sobre biopelículas de *E. faecalis*, sólo las combinaciones que contenían clorhexidina al 2 % eran capaces de inactivar las biopelículas (24,33-36). Clegg *et al* (36) también observaron que cuando aplicaban clorhexidina al 2% durante 15 minutos sobre biopelículas de *E. faecalis* se inhibía completamente el crecimiento. Sin embargo, al observar a microscopía electrónica de barrido, las biopelículas, aunque inactivas, estaban prácticamente intactas debido probablemente al poder de fijación de la clorhexidina. De esta forma, esta porción residual orgánica de la biopelícula podría devenir como fuente de toxinas e interferir en el éxito de la obturación y, finalmente, del tratamiento.

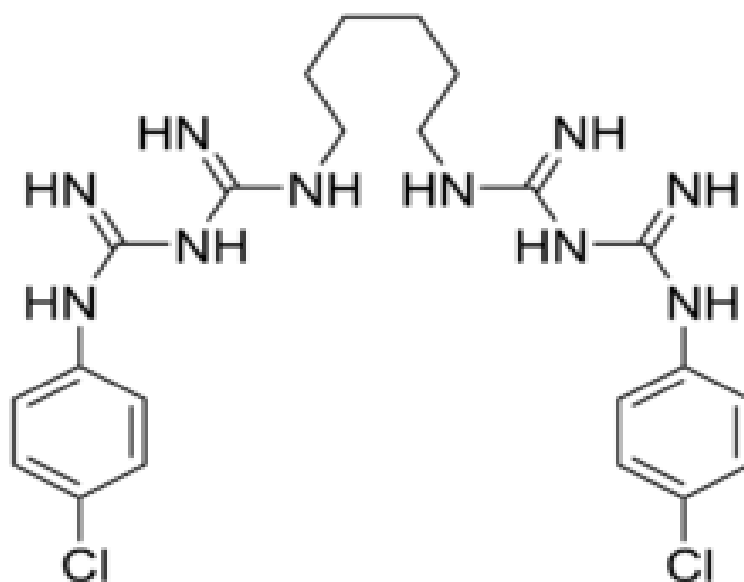


Fig. 2: Fórmula de la clorhexidina

3.5. EDTA

El ácido etilen-diamino-tetracético, también denominado con menor frecuencia AEDT, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica (Fig. 3).

Resulta eficaz para eliminar el barrillo dentinario e incrementar la permeabilidad de la dentina (37), sin embargo, varios estudios donde se utilizó EDTA a diferentes concentraciones y tiempos de exposición han demostrado que no resulta eficaz para la eliminación de biopelículas y que su efectividad sobre bacterias plantónicas se produce a concentraciones mayores del 10%, o a tiempos de exposición superiores a 10 minutos (33).

Normalmente el EDTA suele utilizarse conjuntamente con otras sustancias con poder bactericida en soluciones irrigantes (37).

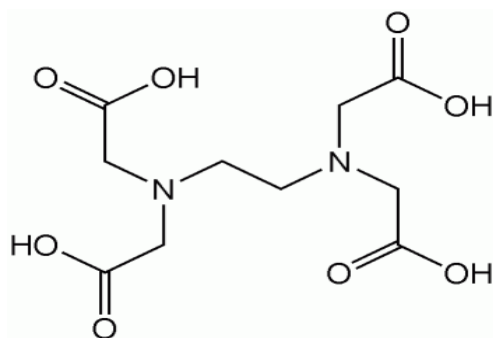


Fig. 3: Fórmula del EDTA

3.6. Soluciones irrigantes mixtas y/o modificadas

En la actualidad existen en la literatura una gran variedad de soluciones irrigantes que combinan diferentes sustancias con propiedades antimicrobianas: combinaciones de quelantes, antisépticos y antibióticos, que aunque han demostrado ser más eficaces que las sustancias por separado y reducir el fracaso del tratamiento de endodoncia, no han resultado ser completamente eficaces (38).

Otra aproximación ha sido introducir modificaciones en sustancias irrigantes clásicas como es el caso del Chlor-XTRA® (Vista Dental Products, Racine, WI), donde al NaOCl se añaden agentes humectantes, modificadores de superficie y alcalinizantes para aumentar la capacidad electrolítica, o como el CHX-PLUS®, donde a la clorhexidina se le han añadido agentes tensoactivos que disminuyen su viscosidad para así aumentar su capacidad de

penetración y, consecuentemente, su eficacia (39). En este caso, al igual que las soluciones irrigantes mixtas antes mencionadas, aunque se ha observado una mayor efectividad, ésta no ha sido completa (36-37).

3.7. Otros métodos de desinfección

3.7.1. Sistema Endo Vac

Es un sistema de irrigación de presión negativa apical que permite irrigar y evacuar la solución irrigante simultáneamente de la cámara y de los segmentos coronales, medios y apicales del conducto radicular (Fig. 4) (40-41). Nielsen *et al* (42) utilizando el sistema Endo Vac encontraron resultados significativamente mejores en el desbridamiento de la terminación apical del conducto radicular, comparados con los encontrados con la irrigación con aguja de presión positiva.



Fig. 4: Endo Vac

3.7.2. RinsEndo

Es un sistema de irrigación del conducto mediante el uso de tecnología de presión-succión. Opera a una presión neumática de 45 Psi con una jeringa de 3,5 mL y una velocidad de riego de 6,2 mL/min. Consta fundamentalmente de una pieza de mano, una cánula de 7 mm de largo de salida única y una jeringa que lleva el irrigante (Fig. 5).

Diversos trabajos han observado resultados prometedores en la limpieza del sistema de conductos radiculares tratados endodóncicamente con este sistema (41).



Fig. 5: RinsEndo

3.7.3. Sistema Endox

El Sistema de Endodoncia Endox® (Lisis Srl, Nova Milanese, Italia) se basa en la liberación de pulsos eléctricos que consiguen vaporizar y eliminar restos de tejido pulpar (Fig. 6). Con este sistema se pueden aplicar descargas predeterminadas ajustadas al volumen y masa del diente a tratar. Además, el aumento de temperatura producida por las descargas reduce el número de bacterias de un modo análogo al producido por la tecnología Láser, de modo que podría ser eficaz en la desinfección de los conductos radiculares (23).



Fig.6 : Endox

3.7.4. Sistemas sónicos y ultrasónicos

Estos sistemas se utilizan conjuntamente con soluciones irrigantes dentro del conducto radicular (Fig. 7), de modo que al activarse las corrientes acústicas generadas producen tensiones de cizallamiento capaces de producir la lisis de las bacterias así como eliminar los

desechos; es, de hecho, una de las técnicas más eficaces para mejorar la limpieza de los conductos (43).

Scott *et al* (43) demostraron que estos sistemas preparan los conductos radiculares significativamente más limpios que los preparados por instrumentación manual únicamente. Sin embargo, en otros estudios se observó que cuando se utilizaban los sistemas sónicos o ultrasónicos como técnica primaria de instrumentación, éstos no parecían ser superiores a la instrumentación clásica. Probablemente, esto sea debido a que la conformación del conducto radicular permita el contacto de las puntas contra las paredes del conducto radicular no completamente conformado, de modo que se restringen sus movimientos vibratorios y consecuentemente su eficacia. Esto es especialmente cierto para los conductos finos y curvos que se encuentran en los molares (43).

Uno de los inconvenientes de esta técnica es la posibilidad de extrusión apical del contenido del conducto radicular, especialmente peligrosa si el irrigante utilizado es tóxico o corrosivo (43).



Fig. 7: ultrasonido dental

3.7.5. Tecnología láser y fotodinámica.

El láser es la resultante de la luz amplificada por la emisión estimulada de radiación. Hay diversas variedades de láser tanto por sus funciones como por sus componentes: Ho:YAG, Er:YAG (Fig. 8), Nd:YAG, Cr:SIG, CO₂ y láser de diodo. Se ha observado que la utilización del láser conjuntamente con irrigantes endodóncicos parece mejorar la eliminación del barrillo dentinario de los conductos radiculares, alterar las biopelículas maduras de *E.*

faecalis y producir la rotura de las paredes de las células; además, con el irrigante se generan ondas de choque que pueden mejorar la descomposición de agentes tales como el hidrógeno, peróxido y ozono disueltos en el agua, de este modo se incrementa la desinfección y desbridamiento de los conductos radiculares tratados endodóncicamente (44-48). Aunque el efecto antibacteriano del láser de diodo de 940 nm posee actividad frente a biopelículas maduras de *E. faecalis*, su efecto es inferior al NaOCL al 5,25%. Sin embargo, la combinación de esa concentración de hipoclorito de sodio con dicho láser tiene efecto sinérgico intensificando la acción bactericida (44).

La acción antimicrobiana del láser es dependiente de la longitud de onda utilizada y del tiempo de aplicación, así, diferentes autores han encontrado distinta efectividad dependiendo del tipo de láser utilizado. En cualquier caso siempre aparece un aumento de temperatura que puede llegar a carbonizar la dentina, producir la anquilosis de la raíz, afectar al cemento y producir necrosis radicular con reabsorción apical (47, 49). Otro inconveniente de la utilización del láser es que pueden llegar a impulsar el irrigante más allá de los límites apicales, con mayor facilidad cuando el foramen apical es grande, con la consecuente necrosis, inflamación, hemorragia y dolor, sobre todo cuando los irrigantes utilizados son potencialmente tóxicos como el hipoclorito de sodio o el peróxido de hidrogeno (50). Otros estudios efectuados han demostrado que el efecto antibacteriano es dependiente de la frecuencia de la radiación, aunque en cualquier caso, cuando se comparaba con el NaOCL al 5,25%, éste resultaba ser más eficaz que cualquiera de las aplicaciones de láser (47).

La terapia fotodinámica (PDT), o desinfección fotoactivada, consiste en la utilización de una luz con una potencia y una longitud de onda específica (40 mW y 60 nm) que produce la activación de colorantes fotoactivos en presencia de oxígeno tales como el azul de metileno (methylene blue; MB) o el azul de toluidina (toluidine blue; TB), ambos no tóxicos. La transferencia de energía desde el fotosensibilizador (activador) y del oxígeno disponible da lugar a la formación de especies muy reactivas como el oxígeno singlete y radicales libres que pueden matar microorganismos por lisis celular y afectación de sus proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos.

La PDT consigue una reducción del 77,5% en la viabilidad de *E. faecalis*. Por otra parte, la utilización del azul de metileno o el azul de toluidina en preparaciones de conductos

radiculares donde se utilizaba NaOCl como irrigante, no producía un efecto bactericida adicional significativo al ya atribuido al propio NaOCl (48, 49, 51).



Fig.8: Laser Er:YAG

3.8. Ozono

El Ozono (O_3) es un gas compuesto por moléculas triatómicas de oxígeno unidas cíclicamente. Su peso molecular es de 48 Da, posee una gran carga de energía ($2O_3 = 3O_2 + 68.400 \text{ cal}$) y un gran poder oxidante, sólo superado por el flúor y el persulfato. Es un gas claro de color azul, inestable que rápidamente desaparece como tal con una vida media de 40 minutos a 20°C , es 1,6 veces más denso que el oxígeno y 10 veces más soluble en agua (49,0 ml en 100 ml de agua a 0°C) (53). Otra de las características del ozono gas es su olor (su nombre procede del griego “ozein” que significa olor). Normalmente se almacena condensado en un líquido azul profundo a muy baja temperatura (52)

El ozono se encuentra de forma natural en la atmósfera, sirviendo como capa protectora de la radiación ultravioleta procedente del sol. Se genera a partir de la energía de la radiación solar que al incidir sobre las moléculas de oxígeno las descompone en dos especies efímeras muy reactivas que reaccionan con otras moléculas diatómicas de oxígeno uniéndose a ellas y dando la forma triatómica que es el ozono (52,53) (Fig. 9).

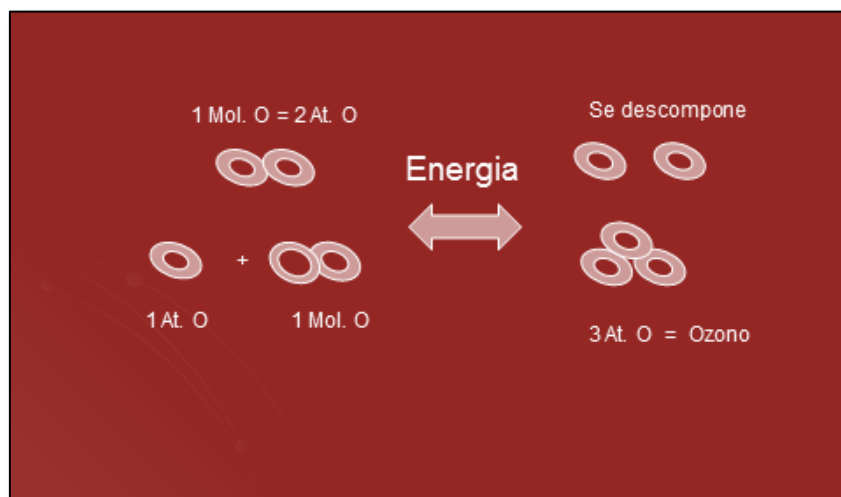


Fig.9: Ciclo del oxígeno-ozono

Análogamente, se puede generar ozono artificialmente con máquinas que aplican descargas con un gradiente de voltaje (5-13 mV) sobre el oxígeno según la reacción: $3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_3$. La fuente de oxígeno puede ser oxígeno atmosférico u oxígeno puro conocido como oxígeno medicinal, en éste último caso el ozono generado se conoce como ozono medicinal y se obtiene en una mayor concentración que cuando se utiliza oxígeno atmosférico (53).

3.8.1. Formas de aplicación de la ozonoterapia

Una vez generado el ozono, éste puede utilizarse en medicina y odontología de tres formas fundamentalmente: aplicado como gas directamente, disuelto en agua destilada (agua ozonizada) y disuelto en sangre (Autohemoterapia) (54, 55).

3.8.1.1. Ozono gas

Posee una gran capacidad germicida frente a bacterias, virus y hongos, debido a su alto poder oxidante (54-56). Normalmente se aplica en odontología a través de una aguja con una única salida apical. La efectividad del ozono gas es proporcional tanto a la concentración obtenida como al tiempo y a la velocidad de flujo con el que se insufla sobre el microorganismo en cuestión, así como al tipo y agregación en el que éste se encuentra (57).

3.8.1.2. Agua ozonizada

Como cualquier otro gas, el ozono se disuelve en un líquido según la ley de Henry. Cuando se disuelve en agua destilada (Fig. 10), el ozono se descompone rápidamente a través

de una serie de reacciones en cadena dando como resultado final radicales hidroxilo altamente reactivos. Este agua ozonizada ha demostrado ser un gran agente desinfectante con potente acción antimicrobiana frente a bacterias, virus y hongos (52). La capacidad germicida del agua ozonizada es altamente dependiente de la concentración de ozono disuelto en el agua, la mayoría de los autores trabajan a concentraciones de 4 mg/mL, aunque algunos autores han descrito buenos resultados a concentraciones inferiores. Probablemente la efectividad antimicrobiana del ozono no depende sólo de su concentración sino también del tipo de microorganismo y, como en el caso de las bacterias, la forma en que se encuentren: forma planctónica o biopelícula (58, 59).

Por otro lado, es importante resaltar que cuando existe materia orgánica disuelta en el agua que se va a ozonizar, la capacidad bactericida de esta agua ozonizada se ve claramente disminuida debido a que el ozono presenta gran avidez por los dobles enlaces de carbono resultando en una concentración de ozono real inferior a la esperada (58-62).

Una de las grandes ventajas que posee el uso de agua ozonizada como agente desinfectante es que posee una gran biocompatibilidad celular y tisular, mucho mayor que la de otros desinfectantes ampliamente utilizados en odontología como el hipoclorito de sodio o el digluconato de clorhexidina (59), así, estudios realizados en fibroblastos L-929 de ratón demostraron la baja citotoxicidad del agua ozonizada comparada con concentraciones del NaOCl al 2,5% (59).



Fig. 10: Equipo para ozonizar agua

3.8.1.3. Disuelto en sangre, Autohemoterapia.

Aunque de poca relevancia en odontología, otra de las aplicaciones médicas del ozono es la denominada autohemoterapia. Es la forma de utilización del ozono más aplicada en medicina y actúa a nivel sistémico. Consiste en recoger la sangre en un frasco de vidrio con anticoagulantes y la medicación necesaria al que se añade el ozono (Fig. 11). La sangre humana expuesta a concentraciones de ozono adecuadas es capaz de “tamponar” sus fuertes propiedades oxidantes, sus efectos secundarios producidos por este tratamiento fueron estudiados en los pacientes tratados observando que la toxicidad era muy baja (53).

En este caso, el mecanismo por el cual actúa el ozono es a través de la formación de dos tipos de especies derivadas de la oxidación:

- Formación de peróxidos (ROS): actúan inmediatamente como segundos mensajeros activando proteína quinasas implicadas en cascadas metabólicas que finalmente activan la expresión génica (53).

- Formación de productos de oxidación de lípidos (LOP): moléculas de larga vida que actúan fundamentalmente sobre células parenquimales. Estas moléculas ejercen un efecto neuroinmuno modulatorio (53).

El resultado final de la acción de estos productos es el aumento en la actividad metabólica y de las funciones inmunes.



Fig. 11: Autohemoterapia

3.8.2. Efecto Germicida del Ozono

Aunque el ozono se utilizó por primera vez en medicina en el año 1870 por Landler, no fue hasta 1932 cuando E. Fisch trató con ozono una pulpitis gangrenosa, observando que se producía una asombrosa mejoría. Éste es probablemente el primer caso descrito de la capacidad antimicrobiana del ozono (55). Hoy en día sabemos que unos pocos segundos de aplicación del ozono son suficientes para detener las funciones vitales de las bacterias, siendo las Gram positivas más sensibles que las Gram negativas y las anaerobias más que las aerobias.

En las infecciones virales la acción del ozono radica en la intolerancia de las células infectadas a los peróxidos generados por la reacción del ozono, la inactivación de la transcriptasa inversa y por la desintegración de la capa lipídica externa en virus con envoltura (55).

El ozono tanto en la fase gaseosa como acuosa tiene un efecto microbicida mil veces más poderoso que otros agentes de destrucción bacteriana, es eficaz a concentraciones mucho más bajas que estos y, además, su acción es mucho más rápida. Con un tiempo de aplicación de 10 segundos mata al 99% de bacterias, hongos y virus, elevándose este porcentaje al 99,9% cuando el tiempo de aplicación se aumenta a 20 segundos (55).

3.8.2.1. *Mecanismo de acción antimicrobiano del ozono*

La acción mediada por el ozono se debe a su alto poder oxidante sobre los compuestos orgánicos: provoca la peroxidación lipídica, rompe los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los ácidos grasos insaturados destruyendo las paredes celulares y las membranas citoplasmáticas de las bacterias y hongos, de modo que se altera su permeabilidad con la consecuente pérdida de funciones (56-58, 61-63).

Una vez que la membrana ha sido dañada y la permeabilidad ha sido alterada, las moléculas de ozono pueden entrar fácilmente en las células provocando la oxidación de las proteínas y la pérdida de función de los orgánulos (64). Análisis por microscopía electrónica de *Streptococcus mutans* tratados con agua ozonizada mostraba huecos en la membrana de los mismos (58). Nagayoshi *et al* (58-59) utilizaron la técnica SYTOX Green dye para detectar cambios en la permeabilidad de la membrana de *S. mutans* tratado con agua ozonizada, observando que la acción bactericida del agua ozonizada ocurría a través del desorden estructural y funcional de la membrana citoplasmática. Por el contrario, a dosis terapéuticas

las células humanas no se ven afectadas por el ozono debido a la gran capacidad de óxido-reducción que poseen (55).

La capacidad bactericida del ozono disuelto en un medio líquido es altamente dependiente de la concentración de ozono alcanzada en el mismo, así como, de la cantidad de materia orgánica presente en el medio, la temperatura y el pH (56-59 ,62 ,65). Uno de los factores clave es la temperatura del medio acuoso, así, la actividad microbica del agua ozonizada disminuye con el aumento de temperatura, de modo que almacenar agua ozonizada a temperatura ambiente conlleva una considerable pérdida de actividad antibacteriana,

3.8.2.2. Dosis Terapéutica

El ozono de grado médico, también conocido como ozono medicinal, es una mezcla de oxígeno médico (oxígeno puro) y ozono puro, en la proporción de 0,05% - 5% de O_3 y 95% - 99,95% de O_2 (53,55).

Las dosis recomendadas consideradas terapéuticas son: 10-15 $\mu\text{g/mL}$ como mínimo, y 80 $\mu\text{g/mL}$ como máximo, dependiendo de la capacidad antioxidante del individuo y de acuerdo a la patología que se está tratando (53). En terapias sistémicas, normalmente se comienza con la dosis más baja y ésta se va incrementando paulatinamente (53,55). La repetición de dosis bajas activan enzimas como: superóxido dismutasa, catalasa, deshidrogenasa y glutatión peroxidasa, todas ellas parte del complejo sistema enzimático que protegen al organismo contra la acción de los radicales libres (53).

Por otra parte, la exposición de un organismo a bajas concentraciones de un agente induce una adaptación y respuesta beneficiosa, mientras que a niveles altos resulta perjudicial. Se ha postulado que la oxidación de los lípidos, actuando como mensajeros a larga distancia (LOP), pueden transmitir a todos los órganos la información de un estrés oxidativo agudo. El concepto paradójico es que el ozono con el tiempo induce una respuesta antioxidante capaz de revertir un proceso oxidativo crónico (54).

Debido a la inestabilidad de la molécula de ozono, cuando se va a utilizar para terapia médica debe generarse inmediatamente antes de su uso, debiéndose utilizar en menos de una hora ya que pasado ese tiempo se convierte en oxígeno, siendo muy difícil almacenarlo durante largos períodos de tiempo (53). Cuando el ozono se disuelve en agua, su conversión

es prácticamente inmediata, sin embargo, cuando se disuelve en líquidos más viscosos como los aceites, la conversión se ve altamente retardada (53).

3.8.2.3. Toxicidad

La inhalación de ozono puede ser tóxica para el sistema pulmonar, así como por contacto con los ojos ya que las células de los tejidos de estos órganos poseen muy bajo poder antioxidante. De todas formas, las complicaciones descritas por la aplicación de terapias con ozono son muy infrecuentes, en terapias sistémicas son inferiores al 0,001 %, siendo normalmente efectos secundarios tales como: lagrimeo, irritación de las vías respiratorias superiores, rinitis, tos, dolor de cabeza, náuseas ocasionales, vómitos, dificultad para respirar, inflamación de vasos sanguíneos, mala circulación, problemas de corazón y derrame cerebral (53). Siempre que se respeten las dosis y los tiempos de exposición al ozono su uso es completamente seguro tanto para el paciente como para el facultativo, de hecho, no aparece toxicidad en exposiciones de hasta 8 horas a concentraciones de ozono del 0,05 ppm (55).

Nunca se han descrito casos de toxicidad aguda o crónica tras un tratamiento, por el contrario, los pacientes suelen describir una sensación de bienestar debido al efecto neuroinmuno modulatorio que ejerce el ozono (53,55).

En el caso de intoxicación por ozono, el paciente debe ser colocado en posición supina y tratado con vitamina E y N-acetilcisteína (66). El tiosulfato de sodio reduce instantáneamente el ozono disuelto y lo inactiva (54).

Debido al alto poder de oxidación del ozono, todos los materiales que entran en contacto con el gas deben ser resistentes al mismo, tales como vidrio, silicona y teflón.

3.8.3. Breve revisión del uso del ozono en odontología

La terapia con ozono es un campo nuevo en continua expansión y la odontología no ha quedado al margen, aunque sus aplicaciones y resultados son muy controvertidos. Existe una gran cantidad de trabajos publicados en los últimos años donde se valora la eficacia del ozono tanto en su forma gaseosa como acuosa (agua ozonizada) sobre diferentes microorganismos orales, tanto en forma planctónica o como biopelícula. Las discrepancias antes referidas en sus conclusiones se deben casi con toda seguridad a que se han utilizado diferentes equipos generadores del ozono, a las diferentes concentraciones alcanzadas del mismo y a las

diferentes aproximaciones experimentales utilizadas. Brevemente repasaremos algunos de los trabajos y conclusiones más relevantes en nuestra opinión:

Oizumi et al., 1998 (67). Compararon el efecto bactericida del ozono en fase acuosa o gaseosa sobre tres cepas distintas de microorganismos orales: *S. mutans*, *S. aureus* y *C. albican*. Como resultado de la aplicación de ozono gas, el número de células en las tres cepas disminuyó un logaritmo tras 1 minuto de aplicación, cuando se aplicó el ozono gas durante 3 minutos las células viables encontradas estaban por debajo del límite de detección. La exposición directa al ozono gas poseía una mayor eficacia microbicida en comparación con la obtenida al tratar las mismas cepas y en las mismas condiciones con agua ozonizada. Así, el ozono en forma gaseoso podría ser clínicamente útil para la desinfección.

Murakami et al., 2002 (68). Examinaron el efecto de un limpiador de prótesis que utiliza ozono a una concentración de 10 ppm sobre *S. aureus* meticilin-resistente y fago T1. En ambos casos se describió una eficacia similar.

Nagayoshi et al. 2004 (58). Estudiaron la efectividad del agua ozonizada sobre los microorganismos presentes en la flora oral, encontrando que el agua ozonizada (0,5-4 mg/L) era muy efectiva tanto sobre los Gram-positivos como frente a los Gram-negativos. Así, *P. endodontalis* y *P. gingivalis* resultaron más sensibles al agua ozonizada que estreptococos orales y *C. albicans*. También observaron que mayor tiempo de exposición rendía una mayor eficacia bactericida del agua ozonizada. Además, observaron que el agua ozonizada mostraba una completa actividad antibacteriana frente a las biopelículas presentes en la placa dental humana. Asimismo, el agua ozonizada mostraba una fuerte inhibición de la formación de biopelículas *in vitro*. En otro estudio publicado el mismo año (59) comparan la efectividad del agua ozonizada con y sin adición de ultrasonidos, sobre *E. faecalis* y *S. mutans* en la dentina de incisivos bovinos recién extraídos. El número de UFC de ambos gérmenes se reducía significativamente cuando se trataban con agua ozonizada sin ultrasonidos, siendo esta reducción en el número de UFC muchísimo mayor cuando además al agua ozonizada se le aplicaban ultrasonidos.

Arita et al. 2005 (69). Examinaron la eficacia del agua ozonizada (2-4 mg /L) durante 1 min sobre prótesis dentales acrílicas infectadas con *Candida albicans*. Observaron una total erradicación de las células viables de *C. albicans* cuando se exponían al agua

ozonizada. La aplicación simultánea de ultrasonidos conducía a una disminución en la adhesión de *C. albicans* al material acrílico. Los autores concluyen que la aplicación de agua ozonizada puede ser útil en la reducción de la cantidad de *C. albicans* en las bases de las prótesis de acrílico

Hems et al., 2005 (62) Trabajaron con *E. faecalis* tanto en forma planctónica como organizados en biopelículas para evaluar el potencial del ozono como agente antibacteriano, utilizando el ozono tanto en forma gaseosa a un flujo de $5,8 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, como en forma acuosa a una concentración de 0,68 mg/L. El ozono en solución era eficaz frente a células planctónicas a los 240 segundos de aplicación, sin embargo, no era eficaz contra las células de *E. faecalis* en las biopelículas, a menos que fueran previamente dispersadas de las biopelículas por agitación. El ozono como gas no presentaba poder bactericida significativo en ninguno de los casos estudiados: planctónico o biopelícula.

Estrela et al. 2006 (70). Realizaron la evaluación del potencial antimicrobiano del ozono sobre *Staphylococcus aureus* cuando era aplicado a tres soluciones diferentes en un sistema de limpieza ultrasónico. En todos los casos se encontró una fuerte actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Polydorou et al., 2006 (71). Estudiaron la posible actividad bactericida del ozono sobre modelos *in vitro* de cavidades infectadas con *S. mutans* a distintos tiempos de aplicación, 40 seg. y 80 seg. Encontraron que ambos tiempos reducían significativamente el número de *S. mutans* en comparación con el grupo control, sin embargo la exposición más prolongada al ozono presentaba un mayor efecto bactericida sobre los microorganismos dentro de los túbulos de la dentina en las cavidades.

Müller P et al. 2007 (72). Realizaron un estudio *in vitro* para evaluar el potencial antimicrobiano del ozono gas frente a biopelículas maduras de seis especies diferentes de microorganismos cariogénicos. En su estudio se compara la aplicación del ozono durante 60 segundos y la terapia fotodinámica (PDT) frente a tratamientos estándar con clorhexidina (0,2%, 2%) o hipoclorito de sodio (0,5%, 5%). Encontraron que el ozono en forma de gas y la técnica PDT tienen un mínimo efecto bactericida en las biopelículas de los microorganismos cariogénicos (<1 log) Solamente el hipoclorito al 5% fue capaz de erradicar los microorganismos en las biopelículas.

Estrela *et al.*, 2007 (73). Compararon la eficacia bactericida de diferentes desinfectantes en conductos radiculares de dientes humanos infectados con *E. faecali*: agua ozonizada, ozono gaseoso, NaOCl al 2,5% y clorhexidina al 2%.

Los irrigantes se utilizaron a un flujo constante de 50 mL/min⁻¹ durante 20 min. El ozono gaseoso se aplicó durante 20 minutos. En ningún caso, ni los irrigantes ni el ozono gas fueron suficientes para matar a *E. faecalis*.

Anca Virtej *et al.* 2007 (23). Estudiaron y compararon el efecto de diferentes antimicrobianos y sistemas sobre microorganismos orales. En las conclusiones de su trabajo se destaca que no existen diferencias significativas entre la capacidad bactericida del NaOCl 3%, el MTAD y el ozono gas (producido por el equipo HealOzone®) sobre las infecciones bacterianas mixtas existentes en los conductos radiculares.

Existen más estudios recientes sobre el efecto bactericida del ozono que vamos a discutir y detallar de forma más pormenorizada a lo largo de este trabajo, por eso no los incluimos en esta pequeña relación, que aunque podría ser mucho más extensa, solamente pretende hacer una reseña a la situación actual de la utilización del ozono en odontología.



OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Con el presente trabajo de investigación pretendemos demostrar la utilidad del ozono como coadyuvante en la desinfección de los conductos radiculares tratados por endodoncia. Para ello nos planteamos dos objetivos concretos.

1º - Valorar la eficacia del ozono gas cuando se aplica sobre dientes humanos extraídos y posteriormente infectados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Comparar la eficacia de dos equipos generadores de ozono gas: Prozone® (Proz) vs Medozon Compact® (GMB).

2º - Valorar la eficacia del ozono, tanto en forma gaseosa como disuelto en medio líquido, sobre células planctónicas y biopelículas maduras de *E. faecalis* generados en laboratorio en microtubos de polipropileno.



III. MATERIAL Y MÉTODO

1. APLICACIÓN DE OZONO GAS SOBRE CONDUCTOS RADICULARES PREVIAMENTE INFECTADOS CON *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.

1.1. Obtención de los dientes humanos

Los dientes utilizados para la experimentación fueron extraídos de pacientes que presentaban enfermedad periodontal o necesidad de tratamiento de ortodoncia. En todos los casos les fue solicitado a los pacientes el respectivo consentimiento informado. Los dientes, una vez extraídos, fueron conservados en agua estéril, renovándose ésta dos veces por semana hasta proceder a la experimentación.

1.2. Preparación de los dientes

Una vez obtenidos todos los especímenes se procedió a seleccionar solamente los dientes unirradiculares para trabajar con una muestra lo más homogénea posible.

Después de la limpieza y desinfección externa se procedió a la eliminación de la corona por la unión corono-radicular con fresa de diamante a alta velocidad y abundante refrigeración. Se midieron todas las raíces y finalmente fueron seleccionados los que presentaban una longitud de 12 mm.

La preparación y manipulación fue realizada en el laboratorio de Patología y Terapéutica Dental II de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

1.3. Limpieza de los conductos y conformación

1.3.1. Preflaring

Se permeabilizaron los conductos radiculares hasta su longitud de trabajo con lima Flexofiles® (Dentsply-Maillefer, Baillagues, Switzerland) hasta el número 20.

Para lubricar el conducto se utilizó EDTA al 17% en gel, Glyde® (Dentsply-Maillefer, Baillagues, Switzerland).

1.3.2. Remoción de las interferencias y conformación del conducto

Fueron utilizados instrumentos de NITI, sistema rotatorio de ProTaper® (Dentsply-Maillefer, Baillagues, Switzerland) con un motor endodónico X-Smart®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó la instrumentación siguiendo la siguiente secuencia con el torque y velocidad antes mencionado:

- a) ProTaper Universal S1 hasta la longitud de trabajo.
- b) ProTaper Universal S2 hasta la longitud de trabajo.
- c) ProTaper Universal F1 hasta la longitud de trabajo.
- d) ProTaper Universal F2 hasta la longitud de trabajo.
- e) ProTaper Universal F3 hasta la longitud de trabajo.
- f) ProTaper Universal F4 hasta la longitud de trabajo.

Entre cada lima se irrigó con 3 mL de hipoclorito de sodio al 5,25% Dentaflux®, (Dentaflux, Ripoli, Madrid, España) durante 1 minuto, a una temperatura entre 37-40°C con jeringa Monoyect® (Ballymoney, N Ireland) y con aguja específica endodóntica Max-I-Probe® 30 G (Dentsply-Maillefer, Baillagues, Switzerland).

1.3.3. Gauging apical

No fue determinado el diámetro apical de los conductos ya que la medida no era de interés, simplemente se necesitaba una perfecta limpieza en el sistema de conductos.

1.3.4. Conformación final del conducto

Se utilizó una lima ProTaper Universal® (Dentsply-Maillefer, Baillagues, Switzerland) F5 hasta la longitud de trabajo, con la velocidad y torque antes mencionados. Se irrigó con 3 mL de hipoclorito de sodio al 5,25% Dentaflux®, (Dentaflux, Ripoli, Madrid, España) durante 1 minuto a una temperatura entre 37-40°C. Además, para aumentar la efectividad del hipoclorito de sodio se aplicó vibración ultrasónica (P5 Booster Suprasson®, (Satelec)) a una potencia de 7 sin irrigación, utilizando para ello una lima de acero K15-21 a la longitud de trabajo.

1.3.5. Irrigación final

Se irrigó con 3 mL de EDTA al 17% Dentaflux®, (Dentaflux, Ripoli, Madrid, España), seguido de 3 mL de hipoclorito de sodio al 5,25% durante 1 minuto; finalmente se realizó un lavado del conducto con 5 mL de agua destilada.

1.4. Preparación de los dientes para la experimentación

1.4.1. Montaje y enumeración

Todas las muestras fueron observadas al microscopio estereoscópico odontológico para corroborar que no quedara tejido pulpar ni detritos y que sólo existiera un conducto.

Si en la observación el conducto no aparecía totalmente limpio se procedía a repetir los pasos desde la conformación final del conducto hasta conseguir una total limpieza del mismo. Del mismo modo, las muestras que presentaban dos conductos fueron desechadas.

A las muestras que cumplían ambos requisitos se las procedió a sellar el ápice siguiendo el protocolo estándar:

- a) Secado y grabado con ácido ortofosfórico al 37 %.
- b) 2 capas de adhesivo.
- c) Fotopolimerizado.
- d) Obturación con composite del ápice para confinar las bacterias.

Una vez sellados los dientes, y previamente a la inoculación con *E.faecalis*, se procedió a la esterilización de los mismos en agua destilada: autoclave 121°C 15 minutos. Paralelamente, se realizaron bases de silicona adaptadas a cada diente para facilitar la posterior inoculación. Estas bases fueron colocadas en bolsas individuales y esterilizadas en autoclave (Fig. 12).

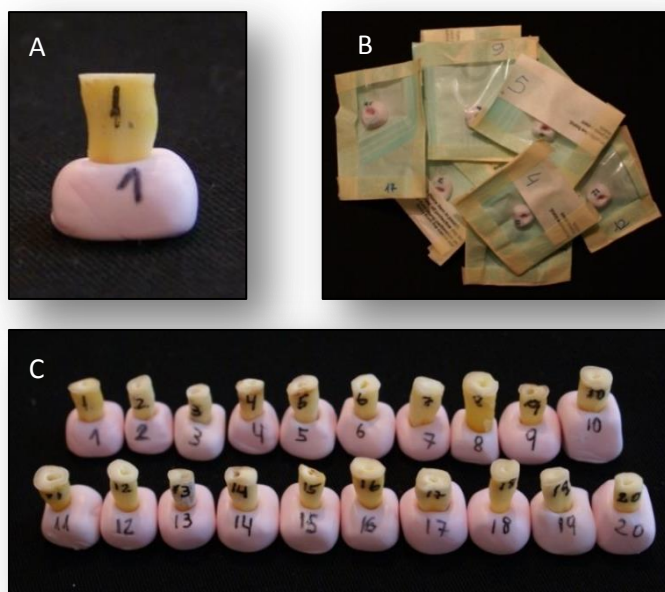


Fig. 12: A: Diente preparado en la base de silicona, B: Bases esterilizadas, C: muestra total.

1.4.2. Inoculación de los conductos radiculares con *E. faecalis*

La cepa ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis* se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), se cultivó aeróbicamente 18 h a 37° C en Brain-Heart Infusion (BHI) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) y se ajustó a 0,5 unidades Mc Farland (Fig. 13).

Alícuotas de 20 μ L procedentes del cultivo anteriormente descrito fueron inoculadas en el interior del conducto radicular. Inmediatamente se procedió al sellado coronal del conducto con una bolita de algodón previamente esterilizado y cemento provisional.

Como control negativo se utilizaron dientes inoculados con 20 μ L de medio estéril. Una vez sellados, los dientes se sumergieron en tubos Falcon con 5mL de caldo Brain-Heart y se incubaron a 37°C durante 21 días con agitación suave. El medio fue reemplazado cada 3 días.



Fig. 13: Tubos Falcon con los dientes inoculados con *E. faecalis*.

1.5. Procesamiento de los dientes inoculados

Antes de manipular los dientes se procedió a desinfectar la superficie externa de los mismos con una toallita de clorhexidina durante 3 minutos, sumergiéndolos a continuación en agua destilada estéril otros 2 minutos (Fig. 14). Finalmente, los dientes inoculados y listos para la experimentación fueron divididos en tres grupos al azar.



Fig. 14: Tubos Falcon con los dientes infectados sumergidos en agua destilada

1.6. Análisis de infección previa de los dientes

1.6.1. Infección experimental

En primer lugar se procedió a comprobar la infección de los dientes tras los 21 días de incubación. Para ello, se eliminó la obturación provisional (Fig. 15) y se tomaron 2 muestras: una con puntas de papel estéril y la otra con lima K 15-21 que se introdujeron en 5 mL de caldo BHI estéril y se incubaron a 37°C. La infección fue confirmada por turbidimetría a las 16 h. (Fig. 16). Seguidamente a la toma de muestras con las puntas para confirmar la

infección previa, se procedió a aplicar el ozono gas. Esto se realizó en todos los dientes salvo en los controles positivos y negativos a los que solamente se tomó las muestras de comprobación de la infección.

En el conjunto de la experimentación se realizaron tres ensayos independientes constando cada uno de 20 dientes inoculados e incubados durante 21 días. Aunque se procedió a aplicar el ozono gas como a todos los dientes como se describió anteriormente, sólo se tuvieron en cuenta para el estudio aquellos dientes que dieron crecimiento positivo de infección previa. En nuestro diseño experimental, la aplicación del ozono gas inmediatamente después a la toma de muestra de infección previa, se debe al hecho de que la confirmación de la infección por turbidimetría es sólo posible tras incubación durante 16 horas.

Los dientes que presentaban infección fueron divididos en dos grupos (n=20, para cada grupo). A cada grupo se le aplicó el ozono generado por el equipo correspondiente. Cada grupo, una vez aplicado el ozono gas, fue a su vez subdividido en tres subgrupos atendiendo al tiempo transcurrido desde la ozonización hasta su procesado para comprobar la presencia o ausencia de infección.

Subgrupo 1D: Se determinó el crecimiento microbiano tras un día de incubación después de la aplicación del ozono.

Subgrupo 7D. Se determinó el crecimiento microbiano tras 7 días de incubación después de la aplicación del ozono.

Subgrupo 14D: Se determinó el crecimiento microbiano tras 14 días de incubación después de la aplicación del ozono.

Del total de muestras analizadas dieron crecimiento previo de infección: 40 dientes y 5 controles positivos. En ningún caso se observó infección en los controles negativos.



Fig. 15: Eliminación de la obturación provisional



Fig. 16: Equipo de medición de turbidimetría

1.6.2. Aplicación del ozono gas a los conductos radiculares

En todos los casos se aplicaron 20 mL de ozono gas a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 1 minuto (velocidad de flujo de 0,33 $\text{cm}^3 \text{s}$). La concentración utilizada es la recomendada con capacidad terapéutica (53). El ozono gas fue generado a partir de dos aparatos: 1) con una máquina de uso médico humano, Medozon Compact® que genera ozono a partir de oxígeno médico y 2) con un equipo odontológico Prozone® W&H, que genera el ozono a partir del oxígeno del medio ambiente. La diferencia entre ambos equipos es que la concentración de ozono obtenida con el aparato Medozon Compact® es muy superior ya que

el oxígeno médico precursor del ozono se haya en mucho mayor concentración que el oxígeno precursor que se encuentra en el medio ambiente que utiliza el equipo odontológico de Prozone®.

Para la aplicación del ozono gas en los conductos se utilizaron dos tipos diferentes de aguja según el aparato generador de ozono utilizado. En el caso del Herrmann

Compact®, se utilizó una aguja microperforada (74) que aprovecha al máximo las capacidades físico químicas del ozono; por el contrario, en el caso del equipo odontológico Prozone® se utilizó la aguja con salida apical única que ya viene incluida en el aparato (Fig. 17, 18).

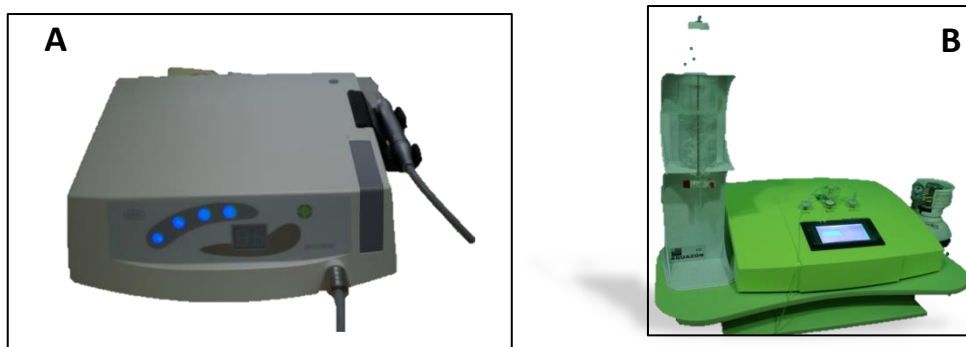


Fig. 17: Equipo de ozonoterapia: A; odontológico, Prozone®, utiliza el aire del medio ambiente. B; médico, Herrmann®, utiliza oxígeno medicinal.

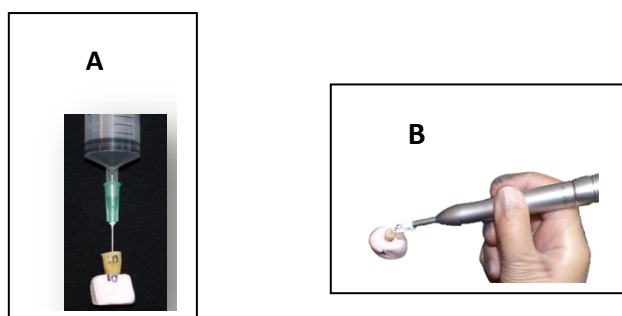


Fig. 18: Diente en su base recibiendo el tratamiento de ozono: A: con jeringa, O₃ medicinal, equipo Medozon Compact®. B: O₃ con oxígeno proveniente del medio ambiente, equipo odontológico Prozone®.

Una vez aplicado el ozono gas en los conductos, se procedió a una nueva obturación de los mismos como se describió anteriormente, es decir, se puso una bolita de algodón estéril y se selló con cemento provisional. A continuación, los dientes tratados y sellados, fueron incubados en 5 ml de BHI a 37°C a tres tiempos diferentes: 1 día; 7 días; 14 días (Fig. 19).



Fig. 19: Muestra en los tubos Falcon en la incubadora

1.6.3. Procesamiento de los dientes después de aplicar el ozono

Al alcanzar el tiempo correspondiente de incubación de cada grupo antes descrito: 1 día, 7 días y 14 días; se procedió a su procesamiento para comprobar la presencia/ausencia de infección. En todos los casos y a todos los tiempos se hizo de la siguiente manera: se tomaron dos muestras con puntas de papel, una inmediatamente después de la eliminación de la obturación provisional, y la otra después del raspado del conducto con una lima K15-21 (Fig.20). Las puntas con la muestra recogida fueron incubadas en 5 mL de caldo BHI a 37°C durante 16 h. Tras la incubación la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano fue confirmada por turbidimetría.

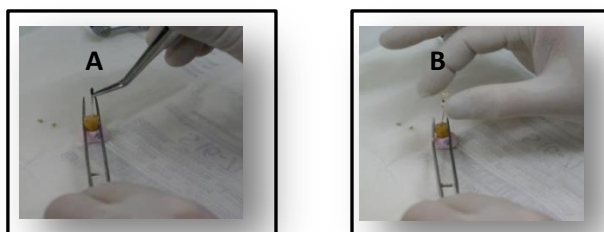


Fig. 20: Procesamiento de los dientes, A: Punta de papel, B: Lima K15-21.

2. APLICACIÓN DE OZONO GAS SOBRE *E. FAECALIS* TANTO EN FORMA PLANCTÓNICA COMO BIOPELÍCULAS CRECIDOS EN MICROTUBOS DE POLIPROPILENO.

2.1. Obtención de las biopelículas

La cepa de *E. faecalis* se obtuvo y cultivó de la misma manera que la descrita para la inoculación de los conductos radiculares procedentes de dientes humanos: *E. faecalis* crecidos aeróbicamente en caldo BHI a 37 °C durante 18 h y ajustado a 0,5 unidades McFarland.

El ensayo se realizó en microtubos de polipropileno de 0,25 mL y las biopelículas fueron inducidas de acuerdo al método descrito por otros autores con alguna modificación en el protocolo (75). Brevemente, alícuotas (50 µL) procedentes del cultivo de *E. faecalis* como antes descrito ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) fueron incubadas en los microtubos (Deltalab®, España) durante 5 días a 37°C sin agitación. Cada día se retiraron 30 µL del cultivo y se añadieron otros 30 µL de medio fresco BHI (Fig. 21).

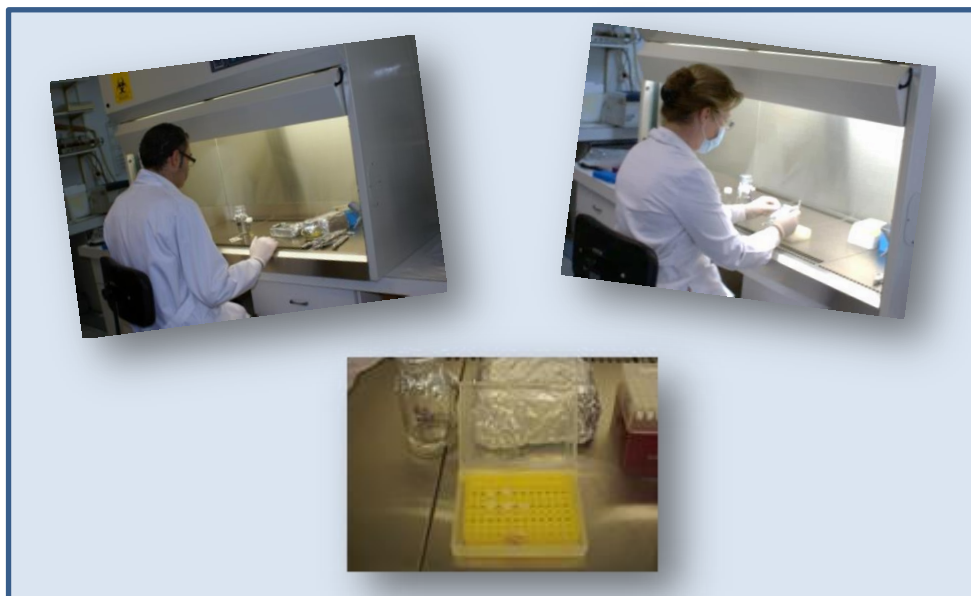


Fig. 21: Cultivo en la campana de Flujo Laminar

Transcurridos los 5 días se procedió a subdividir los cultivos en tres grupos experimentales (n=10 para cada grupo) para realizar los ensayos correspondientes

2.2. Grupos experimentales

Grupo 1: Sin ozonizar En primer lugar, se tomó una alícuota (10 µL) del sobrenadante para el conteo de células planctónicas. Posteriormente, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y los tubos se lavaron 4 veces con 200 µL de BHI para desechar las células no adherentes. Se tomaron alícuotas (10 µL) de cada lavado y se procedió al conteo de las células viables, comprobando que las células viables presentes en el último lavado eran muy inferiores a las encontradas posteriormente al procesar las biopelículas generadas (datos no mostrados). Tras el último lavado, se añadieron 50 µL de medio BHI al microtubo y se agitaron en un vortex vigorosamente durante 60 segundos para despegar y dispersar las células de las biopelículas. Inmediatamente se procedió al conteo de células viables

Grupo 2: Cultivos tratados. Se aplicó ozono gas (20 mL) a una concentración de 20 µg/mL durante 60 seg. en el cultivo con la aguja microperforada. Se tomó una alícuota (10 µL) del cultivo ozonizado y se procedió al conteo de las células viables procedentes de las células planctónicas. Entonces se procedió de la misma forma que para el grupo 1, se retiró el sobrenadante cuidadosamente, se lavó 4 veces, se añadieron 50 µL de medio BHI, se agitó en un vortex vigorosamente durante 60 seg. y se procedió al conteo de células viables (biopelículas).

Paralelamente, se realizó un tratamiento con NaOCl como agente antibacteriano de referencia usado en endodoncia. Se añadieron 50 µL de NaOCl al 5,25 % al cultivo, alcanzando una concentración final de NaOCl de 2,61 % y se dejó actuar 60 seg. después de lo cual se tomaron 10 µL para realizar el conteo de las células planctónicas viables. Posteriormente se procedió de la misma forma que en el ensayo anterior donde se aplicó el ozono. Esto es, se retiró el sobrenadante y se lavó 4 veces con medio BHI para eliminar la concentración residual de NaOCl. Finalmente, se añadieron 50 µL de BHI, se agitó con vortex durante 60 seg. y se procedió al conteo de las células viables procedentes de las biopelículas.

Grupo 3: Biopelículas tratadas directamente. Se procedió de forma similar a la descrita para el grupo 1 hasta retirar el último lavado, tras el cual con la aguja microperforada se aplicaron directamente sobre las biopelículas 20 mL de ozono gas a una concentración de 20 µg/mL durante 60 seg. A continuación, las biopelículas se procesaron y se contaron las células viables de la misma forma que para los grupos anteriores.

De la misma forma que en el grupo anterior, se realizó un tratamiento con NaOCl al 5,25% como control. Así, una vez retirado el último lavado, se añadieron directamente sobre las biopelículas 50 μ L de NaOCl al 5,25 % y se dejó actuar durante 60 seg. Transcurrido este tiempo, se lavó 4 veces con medio BHI y, finalmente, se añadieron 50 μ L de medio BHI y se agitó vigorosamente con vortex durante 60 seg. Inmediatamente se procedió al conteo de las células viables procedentes de las biopelículas.

2.3. Contaje de colonias

Las alícuotas (10 μ L en células plántónicas y 50 μ L en biopelículas procesadas), se llevaron a 3 mL de medio BHI, se diluyeron serialmente (Fig. 22) y se pipetearon 50 μ L sobre placas de Mueller-Hinton Agar; se incubaron durante 48 h a 37°C en condiciones aeróbicas y se procedió al conteo de las UFC.

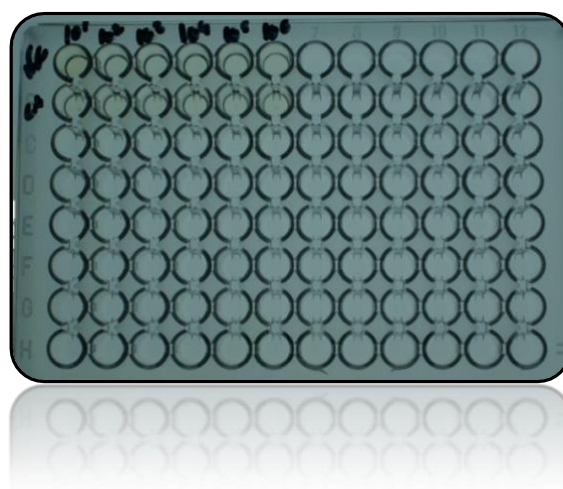


Fig. 22: Dilución seriada de biopelículas de *E. faecalis* procesadas con NaOCl 5,25% y 2,61%.



Fig. 23: Cultivo en placas de Mueller-Hinton

La identidad de las colonias fue confirmada por estudio de la morfología de la colonia y tinción Gram.

2.4. Aparatología

Para la aplicación del ozono se utilizaron dos equipos diferentes:

(a) Medozon Compact® (GMB): Utiliza oxígeno medicinal, obteniendo para su uso una concentración de ozono de 20 $\mu\text{g/mL}$. Se aplicaron 20 mL durante 60 segundos. Para la aplicación en los conductos de los dientes se utilizó la aguja microperforada de salida múltiple.

(b) Prozone® (PROZ): Utiliza oxígeno procedente del medio ambiente, obteniendo para su uso una concentración de ozono de 4 $\mu\text{g/mL}$. Se aplicó de acuerdo a las indicaciones del fabricante durante 60 segundos. Para la aplicación del ozono se utilizó una aguja convencional de salida única apical.

El ozono se aplicó mediante una aguja microperforada: para tratamiento con gas o líquidos de conductos dentales tratados endodóncicamente y enfermedades periodontales patente ES 1067202U (74).

Generador para uso médico Medozon Compact®, concentración de ozono generado entre 5-80 µg/mL.

2.5. Análisis Estadístico

Los resultados presentes en las Figuras 25 y 26 y en la Tabla 2, se expresan como medias y desviación standard. Las diferencias significativas estadísticas entre los diferentes ensayos fueron proporcionadas por el análisis de la Prueba de Fisher.



IV. RESULTADOS

1. EFECTO DEL OZONO GAS EN DIENTES INFECTADOS CON *E.FAECALIS*. COMPARATIVA DE LA EFICACIA DE DOS EQUIPOS DISTINTOS GENERADORES DEL OZONO GAS: GMB VS PROZONE®.

Se utilizaron dos equipos distintos para generar el ozono gas que posteriormente se aplicó sobre los conductos de los dientes que presentaban infección previa, como se explica en Materiales y Métodos. Brevemente:

(a) Medozon Compact® (GMB): Utiliza oxígeno medicinal, obteniendo para su uso una concentración de ozono de 20 µg/mL. Se aplicaron 20 mL durante 60 segundos. Para la aplicación en los conductos de los dientes se utilizó la aguja microperforada de salida múltiple.

(b) Prozone® (PROZ): Utiliza oxígeno procedente del medio ambiente, obteniendo para su uso una concentración de ozono de 4 µg/mL. Se aplicó de acuerdo a las indicaciones del fabricante durante 60 segundos. Para la aplicación del ozono se utilizó una aguja convencional de salida única apical.

Los dientes que presentaban infección fueron divididos en dos grupos (n=20, para cada grupo). A cada grupo se le aplicó el ozono generado por el equipo correspondiente. Cada grupo, una vez aplicado el ozono gas, fue a su vez subdividido en tres subgrupos atendiendo al tiempo transcurrido desde la ozonización hasta su procesado para comprobar la presencia o ausencia de infección.

Subgrupo 1D: Se determinó el crecimiento microbiano tras un día de incubación después de la aplicación del ozono

Subgrupo 7D: Se determinó el crecimiento microbiano tras 7 días de incubación después de la aplicación del ozono.

Subgrupo 14D: Se determinó el crecimiento microbiano tras 14 días de incubación después de la aplicación del ozono.

En la Tabla 1 se presentan de forma cualitativa los resultados de infección de cada una de las muestras analizadas atendiendo al equipo generador de ozono utilizado y al tiempo transcurrido desde la aplicación hasta su procesamiento.

De los resultados obtenidos cabe destacar:

1. La efectividad del aparato GMB con respecto al Prozone® es muy superior en cada uno de los tiempos analizados.

2. En cuanto al tiempo de procesamiento de las muestras ozonizadas con GMB, el número de muestras que presentaban infección fue muy similar en todos los tiempos.

3. Sin embargo, en las muestras que fueron ozonizadas con el equipo Prozone® se observa un incremento de aparición de muestras infectadas relacionado con el tiempo de incubación de las mismas. Así, a mayor tiempo aparecen más muestras infectadas hasta llegar a las muestras incubadas 14 días donde todas las muestras analizadas dieron positivo para la infección.

La figura 24 muestra el porcentaje de casos donde no se encontró infección con cada equipo generador de ozono gas y a cada tiempo de procesamiento de las muestras. Puede observarse claramente la mayor eficacia del ozono generado con el equipo GMB con respecto al equipo Prozone®, así como la relación tiempo-presencia de infección en las muestras ozonizadas con el equipo Prozone®.

Análisis de la infección					
GMB 1D -	PROZ 1D -	GMB 7D -	PROZ 7D -	GMB 14D -	PROZ 14 D -
1	1	1	1	1	0
1	0	1	0	1	0
1	1	1	0	1	0
1	0	1	0	1	0
1	0	1	1	0	0
1	1	1	0	0	0
0		1			
0		0			

Tabla 1: En el total de muestras analizadas previamente tratadas con ozono gas generado por ambos equipos. Siendo 1: ausencia de infección y 0: presencia de infección.

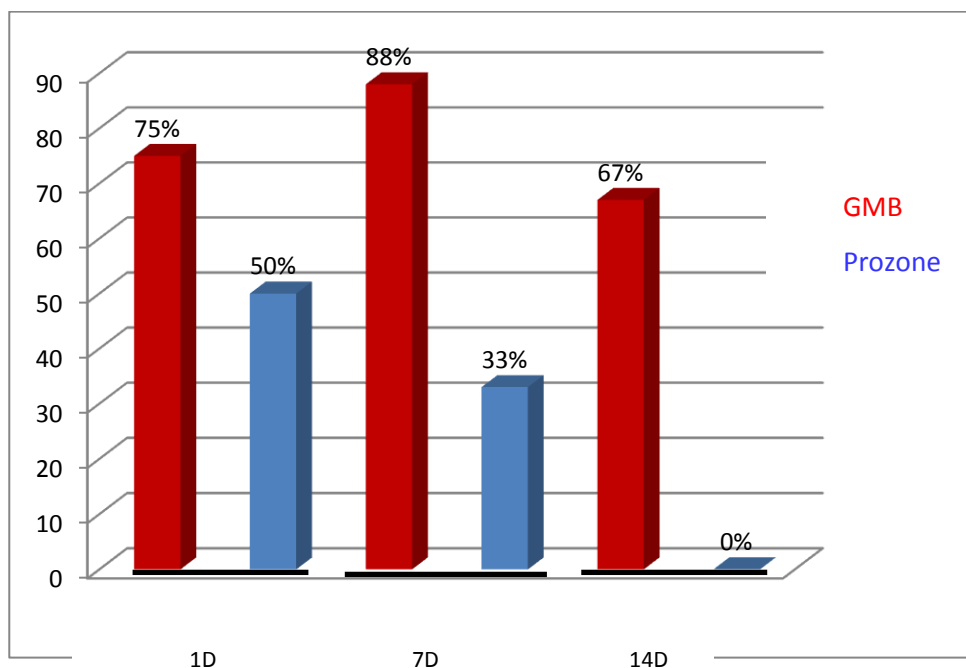


Fig. 24: Porcentaje de muestras que no presentaban infección por *E. faecalis* una vez ozonizadas

2. ENSAYO DE ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL OZONO GAS FRENTE A *E. FAECALIS* CULTIVADO EN MICROTUBOS DE POLIPROPILENO.

E. faecalis fue incubados en microtubos de polipropileno como se describe en Materiales y Métodos, de modo que en el momento de aplicar el ozono gas *E. faecalis* se encontraba en dichos tubos creciendo en dos formas distintas:

- como células planctónicas en el medio de cultivo BHI.
- como biopelículas adheridas al fondo y a las paredes de los microtubos

En cada caso, el ozono gas fue insuflado en el medio de cultivo o directamente sobre las biopelículas de *E. faecalis*. Siempre se utilizaron las mismas condiciones de tratamiento: gas ozono generado por el equipo GMB a una concentración de 20 µg/mL durante 1 minuto; flujo de insuflación 0,33 cm³ s⁻¹. Los resultados de este ensayo se resumen en la Tabla 2

UFC PL C+	UFC BP C+	UFC PL en BHI ozonizado	UFC BP en BHI ozonizado	UFC BP ozoniz
8.75	6.85	7.3	6.91	1
8.49	6.29	8.6	6.9	2.56
8.03	6.83	8.74	6.45	2.38
8.73	6.49	8.61	6.37	2.69
8.76		8.16	6.71	1
8.79			6.71	2.08
8.75				3.3
8.65				4.21
8.68				1
8.73				4.94
8.64	6.62	8.28	6.67	2.51
0.23	0.27	0.59	0,22	1.35

Tabla: 2 Efecto sobre células planctónicas y biopelículas de *E. faecalis*.

UFC PL C+, células planctónicas recuperadas de los cultivos sin ozonizar (control positivo). **UFC BP C+** células recuperadas de las biopelículas procedentes de los cultivos sin ozonizar (control positivo). **UFC PL en BHI ozonizado** células planctónicas recuperadas del cultivo tras la ozonización del medio de cultivo. **UFC BP en BHI ozonizado** células recuperadas de las biopelículas procedentes del cultivo tras la ozonización del medio de cultivo. **UFC BP ozoniz** células recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente, previamente retirado el medio de cultivo.

2.1. Efecto del ozono sobre células planctónicas de *E. faecalis*.

No se observó una diferencia significativa entre las células viables procedentes de los cultivos ozonizados y no ozonizados. (A vs B $p > 0,05$, Fig. 25). Sin embargo, existía una reducción del 36% del número de colonias totales del medio tratado con ozono gas frente al control positivo sin ozonizar. Contrariamente, no se recuperaron células viables de los cultivos control tratados con NaOCl al 2,61 %, apareciendo una diferencia significativa entre las células planctónicas recuperadas de éstos y las recuperadas de los cultivos no tratados (control positivo) y las recuperadas de los cultivos ozonizados (A vs C $p < 0,01$; B vs C $p < 0,01$, Fig. 25).

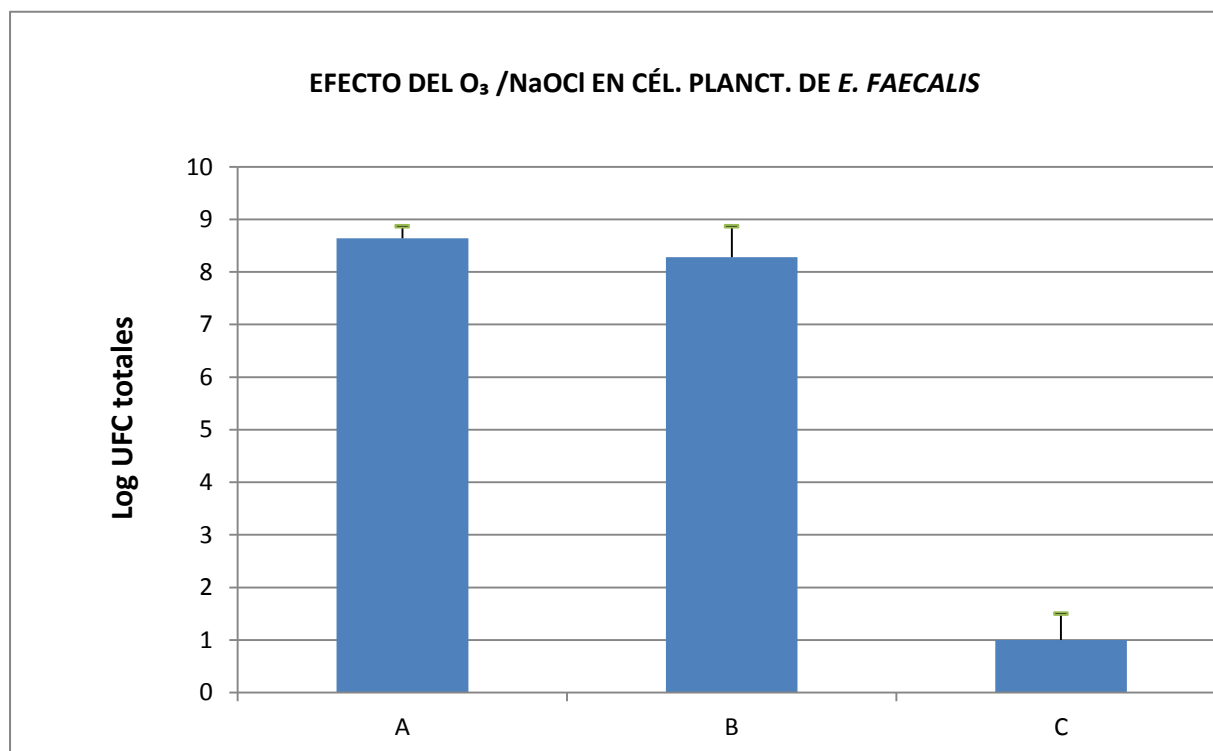


Fig. 25: Número de UFC procedentes de la fase planctónica de los cultivos de *E. faecalis*.

A: sin ozonizar (control positivo), B: cultivo ozonizado, C: Cultivo tratado con NaOCl 2,61%

2.2. Efecto del ozono gas sobre biopelículas de *E. faecalis*

No se observó una diferencia significativa entre las células viables recuperadas de las biopelículas control (sin ozonizar) frente a las células viables recuperadas de las biopelículas procedentes de los cultivos donde se ozonizó el medio de cultivo (A vs B $p > 0,05$, Fig. 26). Así, la reducción del número total de colonias viables era prácticamente nula.

Por el contrario, existía una diferencia significativa entre las células viables recuperadas de las biopelículas control (sin ozonizar), frente a las células viables recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente (A vs C $p < 0,01$, Fig. 26). Del mismo modo, se observó la misma diferencia significativa entre las células viables recuperadas de las biopelículas procedente de los cultivos donde se ozonizó el medio de cultivo y las recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente (B vs C $p < 0,01$, Fig. 26). La reducción del número de colonias totales obtenidas del procesamiento de las biopelículas ozonizadas directamente fue del 99,9% en ambos casos.

No se recuperaron células viables procedentes de las biopelículas tratadas con NaOCl (control negativo) en cualquiera de las dos formas ensayadas.: I) a través del medio de cultivo

(NaOCl al 2,61%), II) directamente aplicado sobre su superficie (NaOCl al 5,25%). Se observó diferencia significativa entre las células viables recuperadas de las biopelículas tratadas con NaOCl y las recuperadas de las biopelículas no tratadas (control positivo) (A vs D $p < 0,01$; A vs E $p < 0,01$, Fig. 26). Del mismo modo, la misma diferencia significativa fue observada cuando se compararon con las células viables recuperada de las biopelículas donde se ozonizó el medio de cultivo (B vs D $p < 0,01$; B vs E $p < 0,01$, Fig. 26).

Como se observa en la tabla 2, la desviación típica encontrada en las células viables recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente (1,35) es mayor que la observada en las células viables de las biopelículas procedente de los cultivos ozonizados (0,22) y las recuperadas de las biopelículas control (0,27). Ello puede ser debido al bajo número de colonias recuperadas de las biopelículas ozonizadas directamente.

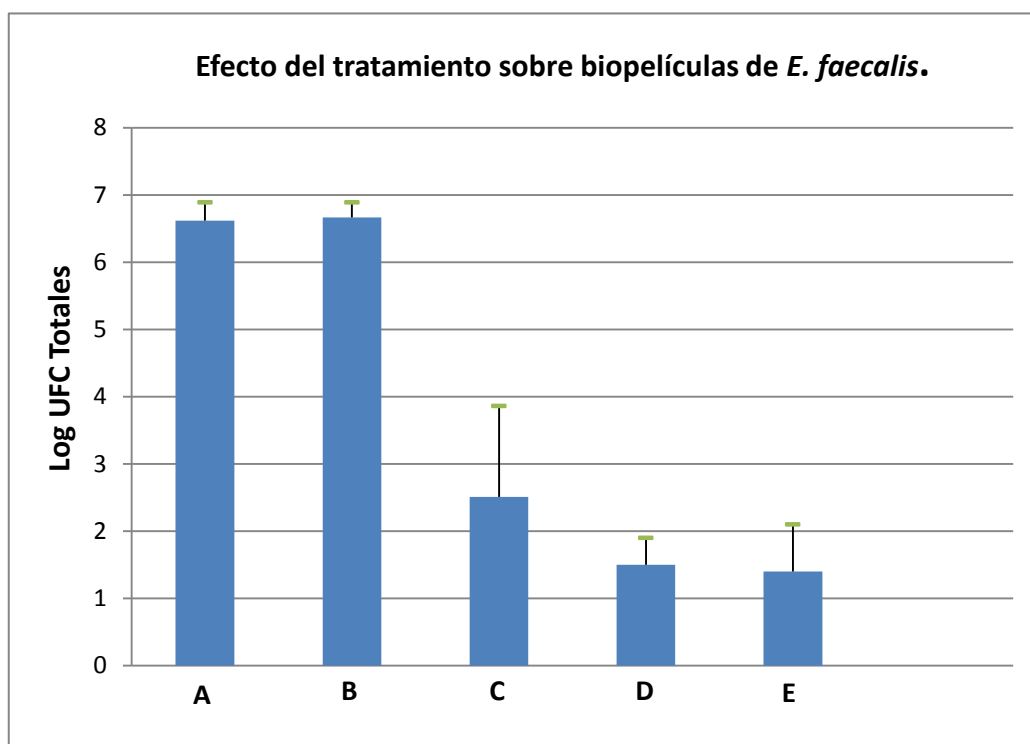


Fig. 26: Número de UFC recuperadas de las biopelículas de *E. faecalis*.

A: sin ozonizar (control positivo). B: biopelículas procedentes del cultivo donde se ozonizó el medio (BHI). C: biopelículas ozonizadas directamente, D: biopelículas procedentes del cultivo tratado con NaOCl 5,25%, concentración final 2,61%. E: biopelículas tratadas directamente con NaOCl 5,25%.

(A vs B $p > 0,05$; A vs C $p < 0,01$; B vs C $p < 0,01$; A vs D $p < 0,01$; A vs E $p < 0,01$; B vs D $p < 0,01$ y B vs E $p < 0,01$).

En la figura 27 se muestran las placas procedentes de los diferentes contajes, tanto de células planctónicas como células recuperadas de las biopelículas, procedentes de los ensayos realizados en microtubos de polipropileno. Los rangos utilizados para el contaje de UFC en las células planctónicas fueron del orden de 10^3 - 10^4 , mientras que el rango utilizado para el contaje de las células viables recuperadas de las biopelículas fue de 10^1 - 10^2 . En el contaje de UFC procedentes de las biopelículas ozonizadas directamente, también se contaron directamente de la muestra, es decir, sin realizar ninguna dilución seriada, no observando en la mayoría de los casos ninguna UFC. Al trabajar en estas condiciones de bajo número de colonias, la aparición de algunas colonias en algunas muestras se traducían en un factor de dispersión notable, lo que explica la mayor desviación típica encontrada en este ensayo con respecto a la encontrada con los ensayos anteriores (ver tabla 2).

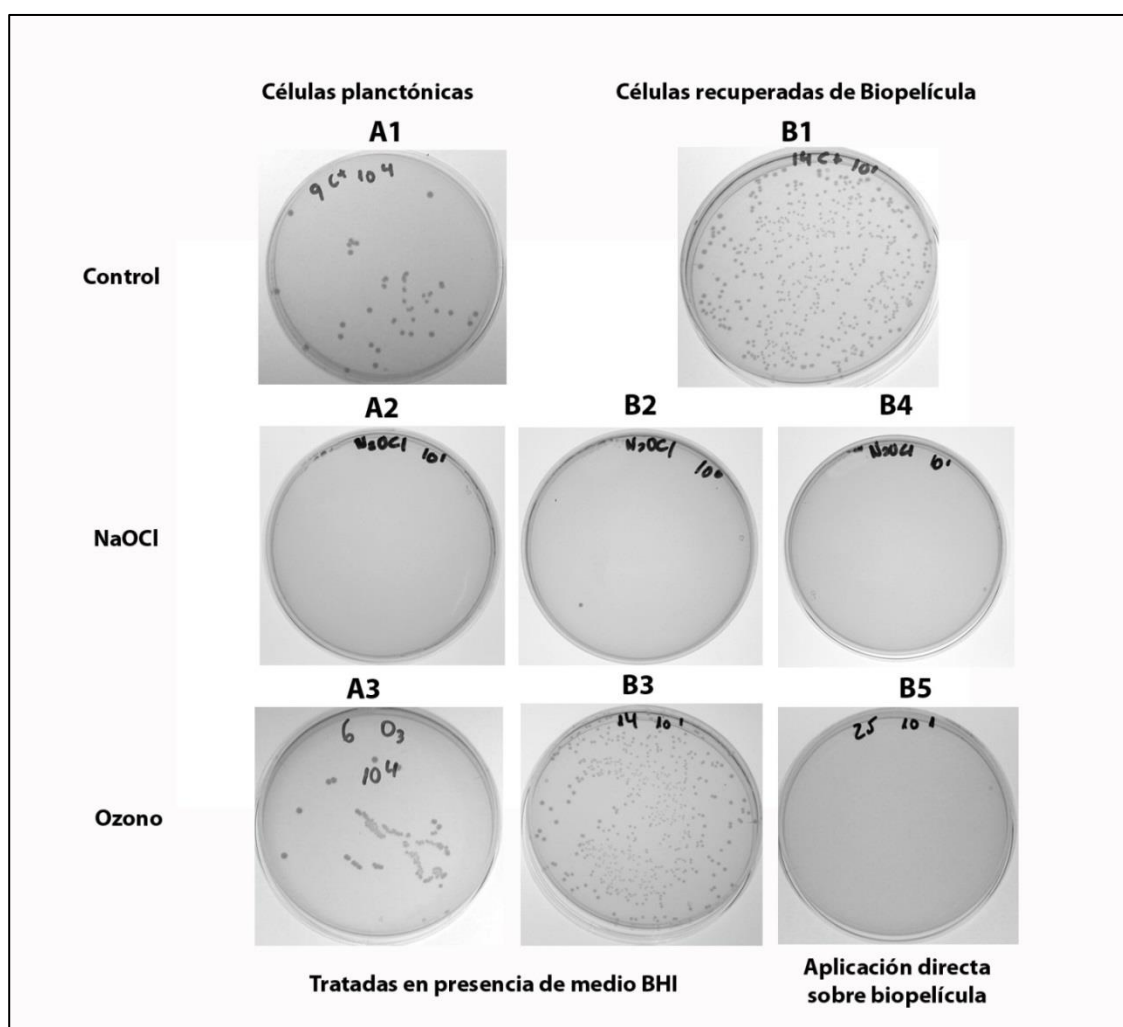


Fig. 27: Células planctónicas y biopelículas de *E. faecalis*

Esta técnica de contaje en placa de las muestras ozonizadas nos permitió no sólo comparar la eficacia del ozono gas sobre *E. faecalis* en los distintos ensayos y en dos formas

distintas de crecimiento, sino también comprobar que las células ozonizadas directamente no eran capaces de crecer al recultivarlas en un medio adecuado para su crecimiento, es decir, el ozono mostraba actividad bactericida absoluta sobre ellas.

La ventaja de esta técnica frente a la medida de absorbancia es que nos permitía comprobar con exactitud la eficacia del ozono en los ensayos en microtubos ya que, en este caso, la absorbancia encontrada podría deberse a células lisadas, no diferenciando entre viables y no viables.



V. DISCUSIÓN

E. faecalis es una bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa que posee la capacidad de adaptarse y crecer en medioambientes con condiciones adversas de poca disponibilidad de nutrientes y bajos niveles de oxígeno, tal como ocurre en los conductos radiculares dentales. Para ello es capaz de expresar genes que favorecen su supervivencia bajo estas condiciones. Posee además una amplia variedad de factores de virulencia tales como citolisinas, sustancias agregantes (unión a células huésped), quimioatrayentes tales como las feromonas, ácido lipoteicoico que estimula la producción de citoquinas y enzimas líticas tales como proteasas e hialuronidasas. Por otro lado, está ampliamente descrita la resistencia de estos microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos (24). *E. faecalis* es capaz además de formar biopelículas que protegen a las bacterias de la acción de la respuesta inmune y de los antimicrobianos y actúan como reservorio de bacterias latentes que pueden liberarse como células planctónicas y provocar una nueva infección (5-6).

Todas estas características, unidas a la compleja anatomía interna de los conductos radiculares que dificultan el acceso de los agentes irrigantes y otras medicaciones, hacen de este microorganismo uno de los principales implicados en el fracaso endodóncico y la persistencia de la infección periapical.

3. DESINFECCIÓN CON OZONO DE DIENTES INFECTADOS *IN VITRO* CON *E. FAECALIS*

En primer lugar, para determinar la capacidad bactericida del ozono gas, y su consecuente utilidad clínica, se optó por generar en los dientes extraídos biopelículas maduras de *E. faecalis* (21 días de incubación) ya que esta situación es muy similar a la que presentan los pacientes con enfermedad periapical persistente. Aunque conjuntamente a la instrumentación mecánica se utilizan una gran variedad de técnicas de desinfección, el NaOCl como irrigante continúa siendo la técnica más utilizada (NaOCl al 0,5% hasta NaOCl al 5,25%). En los últimos años se ha empezado a utilizar el ozono (tanto en sus formas acuosa y gaseosa) como desinfectante de los conductos radiculares como adyuvante de la instrumentación mecánica, describiéndose datos contradictorios sobre la capacidad bactericida del mismo. Esta discrepancia de resultados probablemente sea debida a la gran variedad de concentraciones de ozono utilizadas y de máquinas generadoras del mismo. Así,

en nuestro ensayo en dientes extraídos infectados con *E. faecalis*, probamos dos máquinas diferentes: Prozone®, comercializada para uso odontológico exclusivamente y Medozon Compact®, de uso en medicina humana. La diferencia entre ambas es que mientras el Prozone® W&H utilizando como oxígeno precursor el procedente del medio ambiente sólo alcanza una concentración máxima de 4 ug/mL, el equipo Medozon Compact® utilizando como oxígeno precursor el procedente de oxígeno medicinal alcanza una concentración máxima de 80 µg/mL.

En el presente estudio se observó una mayor actividad del ozono generado por el equipo Medozon Compact® Herrmann. Cuando el recuento de células viables se realizó un día después del tratamiento el porcentaje de dientes con bacterias viables no fue especialmente significativo. Sin embargo, las diferencias se hacen mayores cuando transcurre más tiempo entre la aplicación del ozono y la recuperación de células viables. Así, a los 14 días después de la aplicación de ozono todas las muestras tratadas con el equipo Prozone® dieron resultado positivo de infección, mientras que las tratadas con el equipo Medozon Compact® Herrmann sólo el 33 % dieron positivo.

Estos resultados pueden interpretarse como una diferencia en la capacidad de penetración del ozono en la biopelícula. Ambas máquinas presentaron una capacidad similar para erradicar las bacterias presentes en las capas más superficiales de la biopelícula. En los cultivos realizados un día después del tratamiento, las bacterias de las capas más profundas no podrían todavía liberarse como planctónicas por lo que la cantidad de cultivos positivos fue similar. Cuando la comprobación de recrecimiento microbiano se realiza a los 7 y 14 días después del tratamiento, las bacterias de las capas más profundas de la biopelícula que no han sido afectadas han podido multiplicarse y se encuentran en condiciones de liberarse como células planctónicas.

Las diferencias observadas en el crecimiento a diferentes días de muestras tratadas con la misma máquina pueden tener diversas explicaciones. La imposibilidad de erradicación de la infección podría deberse a la compleja anatomía interna de los conductos radiculares y al posible contenido orgánico presente en los mismos, que es diana para el ozono con la consecuente disminución de la concentración efectiva del mismo en dichos conductos (62, 65). Paralelamente, el ligero aumento de la efectividad encontrada en la ozonización con GMB a los 7 días (88%) con respecto al día 1 (75%), podría atribuirse a la capacidad del

ozono para combinarse con el contenido orgánico presente formando ozónidos, que poseen capacidad bactericida a largo plazo (53). Este efecto a largo plazo de los ozónidos no se observa en el día 1 ya que puede ser que sea poco tiempo para observar el efecto debido a los mismos. Por el contrario, en las muestras analizadas el día 14 los ozónidos han dejado de ser eficaces y así reaparece el recrecimiento bacteriano.

4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DEL OZONO SOBRE *E. FAECALIS* CRECIDO EN MICROTUBOS.

Uno de los mayores inconvenientes de la utilización experimental de biopelículas generadas en dientes extraídos y posteriormente infectados es la elevada variabilidad derivada de las diferencias anatómicas de los conductos, lo que afecta a la formación de las biopelículas y al acceso del ozono a las mismas. Diferentes autores han utilizado diseños experimentales donde han generado y utilizado con éxito biopelículas de *E. faecalis* con 1 día de maduración sobre diferentes superficies (39). El uso de biopelículas experimentales elimina las variables antes mencionadas pero suelen ser generados sobre superficies planas muy diferentes de la geometría tubular del conducto. En nuestro diseño experimental, las biopelículas generadas en los microtubos tras 5 días de incubación son más maduras y probablemente más difíciles de eliminar, similares a las existentes en el tercio apical radicular de dientes con infección, ya que la biopelícula se forma sobre la superficie de un conducto estrecho. De este modo, las diferencias significativas encontradas serán debidas exclusivamente a la propia acción del agente antibacteriano, en este caso el ozono. Además, este diseño nos permitía aplicar el ozono con la aguja microperforada en condiciones muy parecidas a las utilizadas en la práctica habitual de la endodoncia.

La utilización del ozono en odontología, así como su efectividad como agente antimicrobiano frente a patógenos orales, es un campo relativamente moderno y controvertido. Nuestro estudio muestra que el ozono gas en nuestras condiciones de concentración y aplicación es efectivo frente a biopelículas de *E. faecalis* maduras generadas en el laboratorio.

Cuando se trabaja en experimentos sobre capacidad de un agente para matar bacterias, se puede considerar como eficiente una reducción como mínimo de 3 log con respecto al control positivo sin tratar con dicho agente. Esta reducción de 3 log se corresponde aproximadamente

con una efectividad del 99,9 %. Esta “regla” depende mucho del tipo de experimento y de la cantidad inicial de bacterias, así, cuando la cantidad inicial es inferior a 3 log esta reducción de 3 log se puede alcanzar mucho más fácilmente que si la cantidad de bacterias inicial es mucho mayor. Así, por ejemplo, suponiendo una cantidad inicial de $1 \cdot 10^8$ bacterias, una capacidad bactericida del 80 % supondría la muerte de $8 \cdot 10^7$ bacterias, sin embargo eso sólo supone la reducción de 1 log.

En nuestro trabajo, partiendo de una alta cantidad de bacterias logramos una reducción de 4 log cuando comparamos el efecto del ozono aplicado directamente sobre biopelículas de *E. faecalis* tanto frente a las biopelículas control sin tratar (log 6,67 a log 2,5), como frente a las biopelículas donde el ozono se aplicó sobre el medio de cultivo que recubría las mismas (log 6,67 a log 2,5). Similar reducción se observó cuando se compararon las biopelículas control y las procedentes de ozonizar el medio de cultivo que las recubría frente a las biopelículas de los controles tratados con NaOCl al 5,25% directamente y NaOCl al 2,61% en el medio de cultivo.

Cuando comparamos la capacidad bactericida del ozono sobre células planctónicas en el medio de cultivo observamos que la reducción de las mismas comparado con los cultivos control sin tratar no alcanza 1 log (log 8,6 a log 8,2). En número total de bacterias muertas esta reducción se corresponde con un 36 % del control sin tratar ya que la cantidad inicial de partida es muy elevada. Así, aunque este dato es estadísticamente no significativo, cabe pensar que la acción del ozono se ha visto mermada por la propia naturaleza del medio donde se encuentran las bacterias como discutiremos más adelante.

Por el contrario, algunos autores no han observado efectividad bactericida del ozono gas cuando se aplica directamente sobre biopelículas de *E. faecalis*, ni tampoco cuando exponen las biopelículas a agua ozonizada (62). Probablemente ello sea debido a que las concentraciones de ozono utilizadas fueron muy bajas, de hecho, en su trabajo el ozono se aplicó al agua que contenía las biopelículas solamente durante 4 minutos, mientras que otros autores como Huth *et al* (57) describen que para alcanzar la máxima concentración de ozono en agua (20 µg/mL) son necesarios al menos 15 minutos de ozonización. En este mismo estudio también observaron que la efectividad bactericida del ozono gas sobre biopelículas era muy dependiente de la concentración utilizada y del tiempo de aplicación, observando una completa erradicación de las biopelículas a una concentración de 32 µg/mL durante 1 min

o 4 µg/mL durante 2,5 minutos. En el presente estudio se utilizó ozono gas en un volumen de 20 mL a una concentración de 20 µg/mL durante 1 minuto, observando una efectividad del 99,9% cuando se aplicaba directamente sobre las biopelículas de *E. faecalis* (Fig. 26 C y 27 B5). Este resultado confirma que la utilización de ozono gas a las concentraciones recomendadas (53) es tan eficaz como concentraciones mayores utilizadas por otros autores. El efecto del ozono fue similar al observado con el tratamiento NaOCl al 5,25%.

Paralelamente, Huth *et al* (57) también observaron que cuando aplicaban ozono gas sobre placas de agar recién sembradas con *E. faecalis* (células planctónicas), la concentración necesaria de ozono para conseguir una total erradicación era muy inferior (1 µg/mL). Esta diferencia en la concentración de ozono con capacidad bactericida frente a células planctónicas y células en las biopelículas puede ser debida, además de a la mayor resistencia de la bacterias que crecen en biopelícula, a la propia superestructura de la matriz que conforma las biopelículas que consume parte del ozono aplicado, con lo cual se necesitaría una mayor concentración de ozono para que pudiese acceder al interior donde se encuentran las bacterias.

Para observar el efecto que pudiera tener el medio de cultivo sobre la efectividad del ozono, aplicamos éste sobre microtubos que tenían células planctónicas en suspensión así como biopelículas generadas en el fondo y las paredes del microtubo. Al contrario del ensayo anteriormente descrito de Huth *et al*, donde las células planctónicas son sembradas en placas de agar, aplicar el ozono directamente en el medio de cultivo es una situación mucho más parecida a la existente en un proceso infeccioso en el interior de los conductos, donde las bacterias pueden estar inmersas en un exudado con materia orgánica. En nuestras condiciones, observamos una ligera disminución del 36% en el número de células planctónicas viables comparadas con el control. (Fig.25 B y 27 A3). Esta discrepancia puede ser atribuida a la composición del medio de cultivo rico en dobles enlaces de carbono que son diana para el ozono, resultando así una concentración efectiva de ozono en líquido inferior a la que estos autores encuentran con capacidad bactericida sobre células planctónicas sembradas sobre placas de Agar.

Coherentemente, las biopelículas procesadas en estos experimentos donde se aplicó el ozono en el medio de cultivo, no mostraban disminución en el número de células viables recuperadas, ni existía diferencia significativa frente a las biopelículas de controles positivos

no tratados con ozono (Fig.26 B y 27 B3). Esta disminución de la capacidad bactericida del ozono cuando se aplica a medios ricos en materia orgánica es coherente con los trabajos publicados por otros autores que también describen el mismo efecto; así, Restaino *et al* (65) observaron que la capacidad bactericida del ozono sobre distintas cepas bacterianas se reducía drásticamente cuando se añadía seroalbúmina bovina (BSA), siendo la materia orgánica del medio la responsable de la reducción de los niveles de ozono (62, 65).

Johansson *et al* (76) también observaron este mismo efecto de reducción de la capacidad bactericida del ozono cuando se aplicaba sobre bacterias cariogénicas en saliva; el efecto del ozono era muy inferior cuando se comparaba con el encontrado al aplicarlo sobre los mismos microorganismos en suero salino. Además, el efecto iba aumentando con el tiempo de exposición al ozono, es decir, tanto bacterias como proteínas del medio son diana para las moléculas del ozono de modo que al aumentar el tiempo de exposición se saturan las proteínas y el ozono puede actuar sobre las bacterias. En este mismo trabajo, hicieron un estudio por electroforesis en SDS y posterior tinción de plata de las proteínas de la saliva (sin microorganismos) ozonizada a diferentes tiempos de exposición. Ellos observaron que el patrón de proteínas de la saliva se iba alterando de acuerdo a la mayor exposición al ozono hasta que a los 60 segundos de exposición ya no se observaban bandas individuales de proteína, encontrándose éstas totalmente degradadas. Aunque a los 60 segundos de exposición al ozono obtenían una casi total erradicación de las bacterias, en el presente estudio sólo se obtuvo un 36 % de reducción de las mismas. Probablemente esta discrepancia sea debida a que el medio de cultivo utilizado (caldo cerebro-corazón) es un medio mucho más rico en proteínas que la saliva, habiendo por tanto mucha mayor cantidad de moléculas diana para el ozono, traducándose así en una concentración efectiva de ozono inferior.

Por otro lado, algunos autores como Hems *et al* (62) no encuentran diferencias significativas cuando aplican ozono sobre bacterias planctónicas de *E. faecalis* ya se encuentren en caldo de cultivo o en agua. Considerando detenidamente los datos descritos en su trabajo, a los 240 segundos de exposición con ozono de las células planctónicas en caldo de cultivo obtienen una supervivencia del 0,886 %, mientras el mismo tiempo de exposición sobre células planctónicas cuando están en agua rinde una supervivencia del 0,001 %. En ambas situaciones (caldo, agua) consideradas individualmente las diferencias encontradas son estadísticamente significativas (frente al control positivo), mientras que la comparación

entre ellas no lo es, es decir, la naturaleza orgánica del medio no afecta a la capacidad bactericida del ozono. Sin embargo, la relación entre ambos porcentajes de supervivencia obtenidos es 886, es decir, el ozono ha sido 886 veces menos eficaz cuando se aplicó sobre caldo de cultivo que cuando se aplicó sobre agua. Traducido a número de bacterias, en el ensayo donde parten de $1,31 \cdot 10^{11}$ bacterias planctónicas iniciales en agua, tras la exposición con ozono durante 240 segundos obtienen una supervivencia de $2,61 \cdot 10^6$ bacterias (0,001 %), mientras que si ese mismo número inicial de bacterias estuviese en caldo de cultivo las bacterias supervivientes serían $1,16 \cdot 10^9$, prácticamente una reducción de 3 log.

Como se explicó anteriormente, las células de las biopelículas procedentes de ozonizar el medio de cultivo que recubría las mismas no resultaban afectadas ya que el ozono aplicado al medio se consume parte en él mismo y el restante interacciona con la matriz extracelular que conforma la biopelícula. Sin embargo, cuando se aplica ozono sobre suero salino que recubre biopelículas maduras de *E. faecalis* (generadas en conductos radiculares), el ozono sí ha mostrado tener un importante efecto bactericida sobre las mismas (56). Análogamente, el presente estudio demuestra una total erradicación de las biopelículas de *E. faecalis* cuando el ozono es aplicado directamente sobre ellas. Todo esto nos lleva a concluir que las terapias basadas en el ozono gas sobre conductos radiculares infectados serían mucho más efectivas si los conductos se encuentran secos y limpios de materia orgánica residual y de posibles restos de saliva.

Aunque en este trabajo solo se ha estudiado la capacidad bactericida del ozono sobre *E. faecalis*, tanto en forma planctónica como organizados en biopelículas, está ampliamente descrita la capacidad bactericida del ozono, ya sea en forma acuosa o como gas, frente a una gran variedad de patógenos orales tanto aerobios como anaerobios (53, 55, 77), encontrando una mayor eficacia bactericida frente a los anaerobios.

Hasta la fecha, el hipoclorito de sodio (NaOCl) es el irrigante más ampliamente utilizado y su capacidad bactericida a diferentes concentraciones tanto sobre *E. faecalis* como sobre otros patógenos orales está bien documentada (26, 28, 29,78) y mostró su efectividad también en las condiciones utilizadas en el presente estudio. Sin embargo, pese a su efectividad tanto bactericida como digestiva de los tejidos orgánicos, el hipoclorito de sodio presenta una alta toxicidad y puede causar accidentes y lesiones en los tejidos blandos (necrosis). La citotoxicidad de NaOCl al 5,25 % sobre tejido periapical ha sido descrita por varios autores,

así también como edemas, hemorragias, dolor y demás efectos asociados (28-29). De esta manera, muchos clínicos han optado por utilizar concentraciones inferiores de NaOCl para reducir la posible irritación y/o hematomas causados por una posible extrusión del mismo, utilizando concentraciones de NaOCl al 2,5 %. Incluso a estas concentraciones inferiores, la toxicidad del NaOCl sobre fibroblastos L-929 era mayor que la del ozono aplicado como agua ozonizada (59). Esta baja toxicidad, unida a la acción antiinflamatoria y angiogénica del ozono podría resultar en una rápida curación del tejido periapical (55,79).

Otra de las ventajas de la utilización del ozono en odontología es que no genera ni residuos contaminantes, ni corrosión en el instrumental utilizado como ocurre en el caso de la utilización del hipoclorito de sodio (31, 32), ni tampoco resistencias en las bacterias como puede ocurrir en terapias con antibióticos (53, 55). Del mismo modo, podría resultar de gran utilidad en pacientes que presenten alergias a los mismos y/o a otros productos químicos utilizados como desinfectantes en la irrigación de los conductos radiculares tratados por endodoncia.

Finalmente, el ozono ha demostrado ser eficaz para la eliminación de biopelículas microbianas que están detrás de numerosas patologías, entre las que Ricucci *et al* (4) incluyen la periodontitis apical. Aunque no es fácil determinar que una enfermedad sea causada por una biopelícula, Parsek & Singh (80), y posteriormente completado por Hall-Stoodly & Stoodly (81), han propuesto una serie de criterios para definirlas:

- (a) que las bacterias causantes de la infección se adhieran a una superficie.
- (b) que el examen de la zona infectada muestre microcolonias envueltas por una matriz extracelular.
- (c) que la infección se encuentre confinada a un sitio particular aunque pueda ocurrir diseminación de la misma.
- (d) que la infección sea muy difícil o imposible de eliminar con antibióticos aunque los microorganismos sean susceptibles a los mismos cuando se encuentran en forma planctónica.
- (e) una inefectiva respuesta inmunológica del huésped asociada con respuesta inflamatoria.

Ricucci *et al* (4) proponen además el siguiente criterio, la eliminación de la biopelícula lleva a la remisión del proceso infeccioso.

Estos autores encontraron en su trabajo la presencia de biopelículas en un 80 % en periodontitis apicales primarias y en un 74 % en periodontitis apicales post-tratamiento, observando además que cumplían los requisitos anteriormente descritos. Así, con todo lo expuesto y con la alta efectividad del ozono sobre biopelículas de *E. faecalis* encontrada en nuestro trabajo, hace de la terapia con ozono una prometedora herramienta de futuro en el tratamiento de la periodontitis apical.



VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones.

1.- El modelo propuesto para la obtención de biopelículas en tubos de polipropileno presenta dos ventajas fundamentales sobre la infección *in vitro* de dientes extraídos, por un lado asegura un porcentaje del 100% de éxito en la infección y por otro reduce la variabilidad natural en la conformación espacial de los conductos.

2.- Concentraciones terapéuticas (20mL a una concentración de 20µg/mL) de ozono gas aplicadas directamente durante 60 segundos sobre la superficie de biopelículas maduras de *E. faecalis* son capaces de producir una reducción superior al 99,9% de células viables.

3.-La presencia de materia orgánica reduce drásticamente la eficacia bactericida del ozono, como se desprende de la menor reducción de células viables observada en el tratamiento en presencia de medio de cultivo.

4.- La efectividad del ozono, ya sea en forma acuosa o como gas, depende de lo que nosotros denominamos concentración bactericida efectiva del ozono, que asimismo depende de la forma en que se encuentran las bacterias (planctónicas o como biopelículas), de la concentración generada de ozono, de la aplicación efectiva del mismo y del medio en el cual se encuentran.

5. Nuestros resultados demuestran la posible utilidad del ozono gas como tratamiento coadyuvante en la endodoncia y resaltan la importancia de que el conducto a tratar esté seco y libre de materia orgánica residual.

Bibliografía



VII. BIBLIOGRAFIA

1. Molander A, Reit C, Dahlén G & Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; **31**:1-7.
2. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; **34**: 429-34.
3. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; **28**:689-93.
4. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010; **36**:1277-88.
5. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**:1318-22.
6. Stewart P, Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; **358**: 135-38.
7. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB Teixeira FB Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; **34**: 424-428.
8. Molander A, Dahlén G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin used with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003; **96**: 744-49.
9. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB & Souza FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; **36**:1-11.
10. Jhajharia K, Parolia A, Vikram Shetty K, and Kiran Mehta L. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent* 2015; **5**:1-12.
11. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5% sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; **55**:307-312.
12. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; **15**:309-12.
13. Schafer E, y Bossman K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium-hydroxide formulation against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; **31**:53-56.
14. Sjögren U, Figdor D, Spangberg K & G. Sundqvist T. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as short-term intracanal. *Int Endod J* 1991; **24**:119-25.

15. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; **12**:867-72.
16. Sprat D, Pratten J, Wilsonand M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001; **34**:300-07.
17. Jefferson K. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters* 2004; **236**:163-173.
18. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008; **34**:850-4.
19. Stuart Ch, Schwartz S, Beeson T, and Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod* 2006; **32**:93-98.
20. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; **9**:27-36.
21. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010; **36**:70-77.
22. Khemaleelakul S, Baumgartner J, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod* 2006; **32**:312-8.
23. Virtej A, MacKenzie C, Raab W, Pfeffer K, Bartbel C. Determination of the Performance of Various Root Canal Disinfection Methods after In Situ Carriage. *J Endod* 2007; **33**:926-29.
24. Lima K, Fava L, and Siqueira J. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001; **27**:616-19.
25. Alturaiki S, Lamphon H, Edrees H, and Ahlquist M. Efficacy of 3 Different Irrigation Systems on Removal of Calcium Hydroxide from the Root Canal: A Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod* 2015; **41**:97-101.
26. Wong D, Cheung G. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod* 2014; **40**:825-829.
27. Basrani B & Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Topics* 2012; **27**:74-102.
28. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004; **37**:272-80.
29. Kleier D, Averbach R, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: Experience of diplomats of the American board of endodontics. *J Endod* 2008; **34**:1346-50.
30. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; **30**:778-81.
31. Novoa X, Martín B, Varela P, et al. The corrosion of nickel–titanium rotary endodontic instruments in sodium hypochlorite. *Int Endod J* 2007; **40**:36-44.

VII. BIBLIOGRAFÍA

32. Beruti E, Angelini E, Rigolone M, Migliaretti G, Pasqualini D. Influence of sodium hypochlorite on fracture properties and corrosion of ProTaper Rotary instruments. *Int Endod J* 2006; **39**:693-99.
33. Baca P, Junco P, Arias M, González M, Ferrer C. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011; **37**:363-66.
34. Carpio A, Bramante C, Duarte M, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* 2011; **37**:1134-38.
35. Dunavant T, Regan J, Glickman G, Solomon E, Honeyman A. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006; **32**:527-31.
36. Clegg M, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, and Britos LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *J Endod* 2006; **32**:434-36.
37. Alves J, Roque M, Cunha S, et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010; **36**:894-98.
38. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, and Debbia E. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007; **33**:852-54.
39. Williamson A, Cardon J, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008; **20**:1-3.
40. Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered an nontapered canal preparations: An *in vitro* study. *J Endod* 2008; **34**:1374-77.
41. Desai P, Imel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 2009; **35**:545-49.
42. Nielsen B, and Baumgartner J. Comparison of the EndoVac System to Needle Irrigation. *J Endod* 2007; **33**:1-5.
43. Scott A, Jensen SA, Walker, TL, Hutter JW, Nicoll BK. Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod* 1999; **25**:735-38.
44. Castelo P, Martin B, Ruiz M, et al. Combined sodium hypochlorite and 940 nm diode laser treatment against mature *E. faecalis* biofilms *in-vitro*. *J Lasers Med Sci* 2012; **3**:116-21.
45. Hmud R, Kahler W, George R, Walsb L. Cavitation Effects in aqueous endodontic irrigants generated by near-infrared lasers. *J Endod* 2010; **36**:275-78.
46. Mehrvarzfar P, Saghiri M, Asatourian A, et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an *in vitro* study. *J Oral Sci* 2011; **53**:355-360.

47. Piccolomini R, D'Arcangelo C, D'Ercole S, Catamo G, Schiaffino G, and Fazio P. et al. Bacteriologic evaluation of the effect of Nd:Yag laser irradiation in experimental infected root Canals. *J Endod* 2002; **28**:276-78.
48. Silva A, Nuñez SC, Lage JL, Cardoso AO, and Simões. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis in vitro*. *OOOOE* 2006; **102**:93-98.
49. Foschi F, Fontana C, Ruggero K, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. *Laser Surg Med* 2007; **39**:782-87.
50. George R, Walsh L. Apical extrusion of root canal irrigants when using Er:Yag and Er,Cr:YSGG lasers with optical fibers: An *in vitro* dye study. *J Endod* 2008; **34**:706-08.
51. Souza L, Brito PR, Machado J, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; **36**:292-96.
52. Azarpazhooh A, and Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 2008; **36**:104-16.
53. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy State of the art. *Arch Med Res* 2006; **37**:425-35.
54. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Brit J Biomed Sci* 1999; **56**:270-79.
55. Gupta G, and Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life* 2012; **5**:59-67.
56. Case P, Bird P, Kabler W, George R, and Walbs L. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod* 2012; **38**:523-25.
57. Huth K, Quirling M, Maier S, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 2009; **42**:3-13.
58. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, and Nishihara T, et al. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; **19**:240-246.
59. Nagayoshi M, Kitamura Ch, Fukuizumi T, Nishihara T, and Terashita M, et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; **30**:778-81.
60. Noguchi F, Kitamuta Ch, Nagayoshi M, Chen K, Terashita M and Nishihara T, et al. Ozonated water improves lipopolysaccharide-induced responses of an odontoblast-like cell line. *J Endod* 2009; **35**:668-72.
61. Babior B, Takeuchi C, Ruedi J, Gutierrez A, and Wentworth PJr, et al. Investigating antibody-catalysed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**:3031-34.

VII. BIBLIOGRAFÍA

62. Hems RS, Gulabivala K, Ready Y, and Spratt DA, et al. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005; **38**: 22-29.
63. Bünning G, and Hempel DC. Vital-fluorochromization of microorganism using 3', 6'-diacetylfluorescein to determinate damages of cell membranes and loss of metabolic activity by ozonation. *Ozone-Sci Eng* 1996; **18**:173-81.
64. Almaz ME, and Sönmez IS. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *J Formos Med Assoc* 2015; **114**:3-11.
65. Restaino L, Frampton EW, Hemphill JB, and Palnikar. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1995; **61**: 3471-5.
66. Ahmed J, Binnal A, Rajan B, Denny C, and Shenoy N. Ozone applications in dentistry: an overview. *J Exp Integr Med* 2013; **3**:171-176.
67. Oizumi M, Suzuki T, Uchida M, Furuya J, and Okamoto Y. *In vitro* testing of a denture cleaning method using ozone. *J Med Dent Sci* 1998; **45**:135-9.
68. Murakami H, Mizuguchi M, Hattori M, Ito I, Kawai T, Hasegawa J. Effect of denture leaner using ozone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *E. coli* T1 phage. *Dent Mater J* 2002; **21**:53-60.
69. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol* 2005; **20**:206.
70. Estrela C, Estrela CR, Decurcio D, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Braz Dent J* 2006; **17**:134-8.
71. Polydorou OPK, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**:349-53.
72. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 2007; **115**:77-80.
73. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007; **40**:85-93.
74. Pérez Olmedo, JC and Lüdi Etchevarren, VC. Inventores, Agujas para tratamiento con gas o líquidos de conductos dentales tratados endodóncicamente y enfermedades periodontales. Modelo de utilidad: ES 1067202 U (Int. Cl.: A61M 5/32). 2006.
75. Salem H, Elkhatib W, and Noreddin A. Pharmacodynamic assessment of vancomycin-rifampicin combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm: a parametric response surface analysis. *J Pharm Pharmacol* 2011; **63**: 73-79.
76. Johansson E, Claesson R, Van Dijken JWV. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent* 2009; **37**:449-453.

77. Bezirtzoglou E, Cretoiu SM, Alexopoulos A, Lazard V, Nakoue MA. Quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *J Dent* 2008; **36**:600-605.
78. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; **37**:438-446.
79. Di Filippo C, Luongo M, Marfella R, et al. Oxygen/Ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of eNOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2010; **382**:287-91.
80. Parsek MR and Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; **57**:677-701.
81. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; **11**:1034-43.